



Phénotype métabolique des tumeurs associées à des anomalies du cycle de Krebs

Maxime Janin

► To cite this version:

Maxime Janin. Phénotype métabolique des tumeurs associées à des anomalies du cycle de Krebs. Biologie cellulaire. Université Sorbonne Paris Cité, 2015. Français. NNT : 2015USPCB035 . tel-01235065v2

HAL Id: tel-01235065

<https://theses.hal.science/tel-01235065v2>

Submitted on 11 Jan 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Thèse de Doctorat de l'Université Paris 5 - René Descartes

Spécialité :
Biologie Cellulaire et Moléculaire

Ecole Doctorale :
Bio Sorbonne Paris Cité

Présentée par :
Maxime JANIN

Phénotype métabolique des tumeurs associées à des anomalies du cycle de Krebs

Soutenue le 25 septembre 2015

Devant le jury composé de :

Rapporteur 1

Dr Olivier BRAISSANT

Rapporteur 2

Pr David MACHOVER

Examineur 1

Dr Stéphane DE BOTTON

Examineur 2

Dr Virginie PENARD-LACRONIQUE

Directeur de Thèse

Dr Chris OTTOLENGHI

Remerciements

Arriver à la fin d'un doctorat, c'est comme arriver dans les derniers kilomètres d'un semi marathon je crois. Cela parait la partie la plus éprouvante, et pour cause, la fatigue est là, et en trois ans, bien des kilomètres ont déjà puisés dans les ressources. Cependant, cette course c'est déroulé en équipe, supporté par ma famille, mes collègues et mes amis. Pour tout ce qu'ils m'ont donné durant ces moments pas toujours évidents, je tiens du fond du cœur à leur exprimer mes remerciements.

A mon directeur de doctorat tout d'abord, Chris OTTOLENGHI, avec qui j'ai partagé la majeure partie de ces trois années, je te remercie pour tes enseignements, je suis honoré d'avoir eu comme coach une personne aussi talentueuse d'un point de vue scientifique.

Mes pensées s'adressent également à mes collaborateurs, Virginie PENARD-LACRONIQUE et Stéphane DE BOTTON de l'Institut Gustave Roussy et aussi Christophe JUNOT du laboratoire du LEMM au CEA de Saclay.

A ma femme, toi que j'ai rencontré en congrès sous la clairvoyante impulsion de Chris ! Tu sais comment me soutenir et me remplir d'énergie, je souhaite t'exprimer mon infini reconnaissance d'être à mes cotés. Muchas gracias.

A mon directeur de laboratoire, le Pr Robert BAROUKI, merci de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire de Biochimie métabolomique et protéomique au sein de l'hôpital Necker.

A tous les membres du service, mes voisins de bureau en premier lieu, Joëlle et Véronique, avec qui j'ai passé que de bons moments, mais aussi Marie, Odile, Sabine, Martine, Jacqueline, Marylène, Céline, Morgane, Joffrey et Luc, une fine équipe de techniciens !! Je remercie grandement Céline et Florence, doctorantes également au sein du service, ce fut un plaisir de partager ces moments avec vous et je vous souhaite beaucoup de réussite pour la suite. Merci aussi à tous les médecins du service.

Je tiens finalement à exprimer ma gratitude aux membres du jury, pour avoir accepté l'évaluation de mon travail de doctorat.

"Béni celui qui a connu l'épreuve : il a trouvé la Vie"
Jésus

Table des matières

Liste des figures	7
Liste des tableaux	7
INTRODUCTION GENERALE	10
1. Généralités	10
1.1 Métabolites, métabolome et métabolomique.....	11
a) Métabolites	11
b) Métabolome	12
c) Métabolomique.....	12
1.2 Métabolisme et cancer.....	13
1.3 Biomarqueurs et cancer	14
1.4 Landmarks et Hallmarks (repères et caractéristiques).....	15
1.5 Leucémie Aiguë Myéloïde (LAM).....	16
2. Mutations des gènes Isocitrate Déshydrogénase	17
2.1 Tumorigénèse.....	17
a) Prévalence clinique en fonction des tissus affectés	19
b) Conversion de l'alpha-cétoglutarate en D-2-hydroxyglutarate : découverte et fonction.....	21
c) Inhibition des dioxygénases aKG-dépendantes	23
d) Mutations <i>IDH</i> et autres co-mutations.....	25
e) Modèles animaux et cellulaires.....	25
2.2 Intérêt diagnostique	27
2.3 Traitements	28
MES TRAVAUX	29
1. Production de l'oncométabolite D-2-hydroxyglutarate dans les hémopathies malignes avec mutations <i>IDH 1/2</i>	30
1.1 Contexte	30
1.2 Objectifs.....	31
1.3 Technique de séparation et de quantification du D-2-HG	31
1.4 Publications	34
1.5 Résultats et discussion	53
2. Analyse métabolomique dans un modèle d'acidurie D-2-hydroxyglutarique.....	54
2.1 Matériel et méthode	55
a) Les fibroblastes.....	55

2.2 Protocole	55
a) Mise en culture.....	55
b) Conditions de cultures	55
c) Traitement des échantillons	56
2.4 Résultats et Discussion	60
2.5 Résumé et conclusion.....	70
2.6 Discussion	72
3. Oncométabolome, méthylome et succinate déshydrogénase	73
3.1 Contexte et objectifs	73
3.2 Matériels et méthodes	73
3.3 Publications	73
3.4 Résultats et discussion	106
4. Construction de bibliothèques spectrales pour l'analyse des acides organiques en GC tandem MS	106
4.1 Contexte et objectifs	106
4.2 Généralités sur la technique	108
4.3. Matériel et Méthodes	109
4.4. Résultats et discussion	110
DISCUSSION GENERALE	111
BIBLIOGRAPHIE.....	116
WEBGRAPHIE.....	120
5.1 Annexes référencés dans l'écrit	121
Annexe 1 : Les différents sous-types de LAM.....	121
Annexe 2 : Les leucémies myéloïdes aiguës.....	123
a) Prévalence	123
b) Diagnostic	123
c) Traitements	126
Annexe 3 : Altérations génétiques rencontrées dans les LAM.....	128
Annexe 4 : Erreurs innées du métabolisme impliquant les stéréoisomères D et L du 2-HG	129
Annexe 5 : Protocole de silylation	130
Annexe 6 : Protocole de butylation et d'acétylation pour la dérivation chirale du 2-HG	131
Annexe 7 : Composition du cocktail 24 étalons marqués aux isotopes stables (dans eau bidistillée):	132
Annexe 8 : La chromatographie gazeuse.....	133
Annexe 9 : La chromatographie en phase liquide.	134

Annexe 10 : La spectrométrie de masse.	135
Annexe 11 : Liste des transitions MRM développées en GC.	135
Annexe 12 : Liste des transitions MRM développées en fluxomique.	145
Annexe 13 : Tableaux d'analyse des effets de l'inhibiteur AG-221 sur les métabolites.....	146
5. 2 Annexe : Publications et posters	163
Publications relatives à ma thèse	163
Publications supplémentaires	163
Posters scientifiques.....	163
Résumé.....	164

Liste des figures

Figure 1 : Profilage métabolique des biofluides, intégration des technologies analytiques dans les études biomédicales. (source : Jan van der Greef)	10
Figure 2 : Représentation schématisée des "omiques". 22 000 gènes pour 250 000 à 1 million de protéines estimées	13
Figure 3 : Stratégies d'attaque en fonction des caractéristiques du développement tumoral.	15
Figure 4 : L'hématopoïèse : développement des cellules sanguines d'un stade souche à fonctionnel. [WS ref5].....	17
Figure 5 : Résumé des mutations les plus fréquentes des gènes <i>IDH1</i> et 2. [Dang L. <i>et al.</i> , 2010]	19
Figure 6 : Néo fonction enzymatique des formes mutées des gènes <i>IDH1</i> et 2, A) et les deux stéréoisomères D et L du 2-hydroxyglutarate, B).	21
Figure 7 : Influence d'une augmentation de D-2-hydroxyglutarate par mutation des gènes <i>IDH</i> . [Prensner, Chinnaiyan, 2011].	24
Figure 8 : Chromatogrammes obtenus pour deux patients avec mutation <i>IDH1/2</i> et un patient sans mutation.	32
Figure 9 : Exemple de séquence d'analyse.....	59
Figure 10 : Diagramme de Venn de la répartition des métabolites en fonction de la technique d'analyse.....	60
Figure 11 : Heatmaps des variations d'intensité de signal normalisées.	64
Figure 12 : Analyse en composante principale (PCA) de l'effet du temps de culture.....	65
Figure 13 : Effets notoires de l'inhibiteur Agios sur la concentration de certains métabolites.....	69
Figure 14 : Visualisation des gouttelettes lipidiques par marquage au RedOil. Gouttelettes visibles en rouge autour du noyau coloré en bleu.....	70
Figure 15 : Etude de l'action de l'inhibiteur sur le flux, par marquage isotopique d'intermédiaire à partir de la glutamine $^{13}\text{C}_5$	71
Figure 16 : Réseau métabolique proche de la glutamine et effets d'AG-221.	72
Figure 17 : Schéma explicatif de la spectrométrie de masse en tandem.....	108
Figure 18 : Diagramme schématisé de la signalisation intracellulaire associée aux LAM. Figure reprise de T. Naoe, H. Kiyoi, 2013.	125
Figure 19 : Fréquentes interactions d'altérations génétiques dans les LAM, co-mutations.....	125
Figure 20 : Carte des composés marqués par la glutamine $^{13}\text{C}_5$ avec leur nombre de carbones marqués. [Zhang <i>et al.</i> , 2014]	145

Liste des tableaux

Tableau 1 : Mutations des gènes <i>IDH</i> identifiées dans différents types de tumeur. [Yang <i>et al.</i> , 2012].	20
Tableau 2 : Transitions MRM du 2-HG naturel et marqué $^{13}\text{C}_4$	33
Tableau 3 : Conditions de traitement des fibroblastes du patient avec une acidurie et du contrôle. .	55
Tableau 4 : Analyses statistiques de l'effet de base du génotype (R140Q versus WT) sur le phénotype (A), et l'effet du traitement sur R140Q (B). J2: "jour 2", effets à 2 jours considérés isolément.....	66

Liste des abréviations et symboles :

% : Pourcent
°C : Degrès celsius
μL : Microlitre (10^{-9} litre)
μM : Micromolaire (10^{-9} mole par litre)
2-HG : 2-hydroxyglutarate
ADN : Acide déoxyribonucléique
α-KG : Alpha cétooglutarate
AKT1 : Protéine Kinase B
ALFA : Association Française des Leucémies Aiguës
APHP : Assistance Publique -Hôpitaux de Paris
ara-C (HIDAC) : Cytarabine
ARN : Acide ribonucléique
ASO-PCR : Oligonucléotide spécifique d'un allèle-PCR
ASXL1 : Gène Additional sex combs like 1
ATP : Adénosine triphosphate
BCOR : Corepresseur du gène BCL6
BSA : Albumine de sérum bovin
BSTFA : N,O-Bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide
CCM : Chromatographie sur couche mince
CE : Energie de collision
CEA : Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives
cm² : Centimètre carré
CoA : Coenzyme A
COX : Cytochrome c oxidase
C-P4H : collagène prolyl-4-hydroxylase
CPH : cellules progénitrices hématopoïétiques
DNMT3A : DNA (cytosine-5)-méthyltransferase 3A
ERNDIM : Réseau Européen pour l'évaluation et l'amélioration de la recherche, du diagnostic et du traitement des erreurs innées du métabolisme
EZH2 : Gène codant l'Histidine-Lysine N-méthyltransférase
FFPE : Mode de fixation de tissu au formol, inclus dans la paraffine
FS : Mode d'analyse des ions en spectrométrie de masse (FullScan)
FT-ICR : Transformée de Fourier couplé à un spectromètre de masse ion cyclotron resonance
GC : Chromatographie gazeuse
HIF-1 : Facteur induit par l'hypoxie
HMDB : Database du Métabolome Humain
IDH : Isocitrate déshydrogénase
IE : Impact électronique
IGR : Institut Gustave Roussy
IHC : Immunohistochimie
IRTF : Transformée de Fourier à spectroscopie infrarouge
JCO : Journal of Clinical Oncology
JHDM : Gène codant l'histone déméthylase contenant un domaine Jumonji
KDa : Kilo Dalton
KDM : JmJc contenant un domaine histone déméthylase

LAM : Leucémie aiguë myéloïde
 LC : Chromatographie liquide
 m/z : Rapport masse/charge
 mL : Millilitre (10^{-6} litre)
 mmol : Millimole (10^{-6} mole)
 mol : mole
 MRM : Spectrométrie de masse en tandem : Multiple Reaction Monitoring
 MS : Spectrométrie de masse
 MSMS : Spectrométrie de masse en tandem
 mTOR : Cible de la rapamycine
 N : Normal
 NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
 NADP : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
 NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
 NFS : Numération formule sanguine
 NPM1 : Nucléophosmin
 OMS : Organisation mondiale de la santé
 PBS : Tampon phosphate salin : Phosphate Buffered Saline
 PCR : Réaction en chaîne par polymérase
 PFPP : Colonne avec phase stationnaire Pentafluorophenyl Propyl
 PI3K : Phosphoinoside 3-kinase
 RMN : Résonance magnétique nucléaire
 RPM : Rotation par minute
 SIM : Mode d'analyse en spectrométrie de masse d'un ion : Single ion monitoring
 SMD : Syndrome Myélodysplasique
 TET : Gène codant la protéine Ten-Eleven Translocation 2
 TET2 : Ten-Eleven Translocation 2
 TMCS : Triméthylchlorosilane
 TMS : Groupement triméthylsilyl
 TP53 : Gène codant la protéine liée aux tumeur p53
 WT1 : Gène codant la protéine Wilms tumeur
 ZIC-HILIC : Colonne avec phase stationnaire à interactions hydrophiliques

INTRODUCTION GENERALE

1. Généralités

Les 50 dernières années ont été le théâtre de l'émergence de technologies de plus en plus puissantes, en termes de quantité d'information générée, au service de la recherche et de la médecine (figure 1). Un besoin grandissant d'outils d'analyse bioinformatique se couple à un partage organisé des projets de recherche, entre les cliniciens, les chercheurs, les bioinformaticiens dans une vision plus intégrée de la maladie.

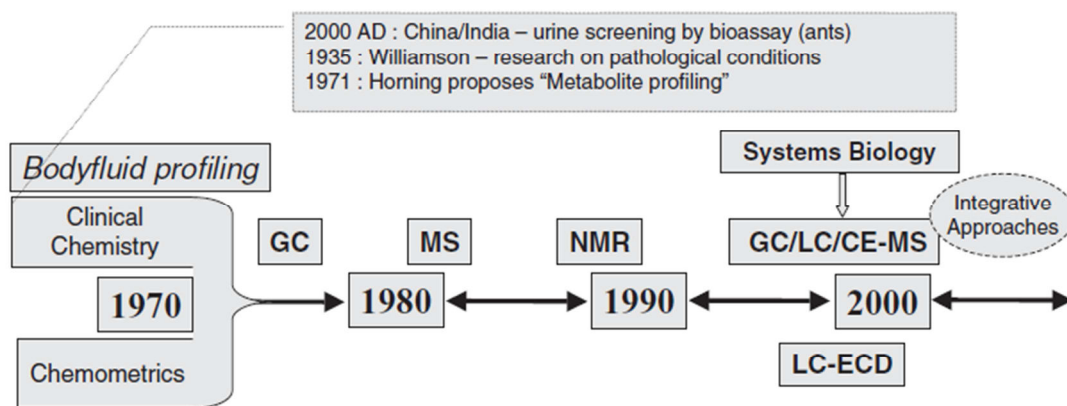


Figure 1 : Profilage métabolique des biofluides, intégration des technologies analytiques dans les études biomédicales. (source : Jan van der Greef)

Cette dynamique d'investigation a permis de séquencer le génome humain et celui de centaines d'organismes (Base de données GOLD (Genome Online Database)), ouvrant un large champ d'investigation afin de mieux comprendre les interactions entre quatre grands domaines :

- L'information génétique et ses altérations : la **génomique**
- L'information portée par l'ARN : la **transcriptomique**
- L'information traduite en protéines : la **protéomique**
- La fonction en rapport avec les concentrations en différents métabolites : la **métabolomique**.

Dans cette approche multidimensionnelle, aucun acteur ne travaille isolément et chacun influence le travail des autres. En effet, ce mécanisme qui paraissait en premier lieu dirigé du

génomique vers le métabolome / protéome, s'avère en réalité beaucoup plus complexe avec des régulations plus ou moins directes de certains métabolites sur la transcription génétique et la régulation des transcrits [Ritchie M.D. *et al.*, (2015)].

Par rapport au génome qui garde une certaine stabilité au cours de la vie d'un individu, et aux variations relativement lentes dans la synthèse de l'ARN et des protéines, le métabolome montre des modifications qualitatives et quantitatives très rapides et très importantes. Il est assujéti à de nombreuses régulations internes et externes et il participe à un *continuum* de transformations qui impliquent les composés xénobiotiques voire dérivés de la flore commensale.

Le terme métabolome a été conçu en référence au génome et aux autres approches "omiques". Il est apparu pour la première fois dans une publication d'Oliver en 1998 [Oliver *et al.*, 1998]. L'étude globale du métabolome (ou métabolomique) s'inscrit au même titre que les études du transcriptome et du protéome dans un contexte post-génomique (Figure 2). Néanmoins, les premières tentatives déclarées d'analyse globale des métabolites sont beaucoup plus anciennes, et remontent aux années cinquante (e.g. le livre « Biochemical individuality » de Roger Williams). Les technologies ayant considérablement évolué, il est maintenant concevable d'étudier par un petit nombre de techniques, le métabolome dans son ensemble, i.e., tous les métabolites, molécules de faibles poids moléculaire (<1500 KDa) au sein d'un organisme uni ou pluricellulaire, d'un organe particulier, d'un tissu ou type cellulaire défini ou encore d'un fluide corporel : plasma, urine, liquide céphalorachidien par exemple. Les métabolites sont des composés impliqués dans les processus métaboliques : substrats, produits ou cofacteurs de réactions enzymatiques ou simplement chimiques [Hatzimanikatis *et al.*, 2004]. Le terme métabolite inclut par conséquent toutes les molécules de faibles masses moléculaires telles que les acides organiques, les sucres, les acides gras, les métabolites conjugués, les acides aminés mais aussi certains peptides (comme le glutathion), les vitamines, les stéroïdes, les xénobiotiques.

1.1 Métabolites, métabolome et métabolomique

a) Métabolites

Les métabolites sont les produits de réactions biochimiques au sein d'un système biologique donné. On appelle endogènes les métabolites qui sont synthétisés directement par l'organisme. Le Human Metabolome Database [WS Ref1] contient actuellement ~4000 métabolites endogènes humains. A ceux-ci s'ajoutent ~30 000 lipides complexes endogènes, qui correspondent souvent à des acides gras de longueurs et structures très différentes associés avec d'autres molécules (e.g., triglycérides, phospholipides, sphingolipides). On distingue ainsi la lipidomique de la métabolomique au sens strict, qui étudie les métabolites

simples/fondamentaux. Le nombre de métabolites endogènes étant donc assez limité (4000 métabolites vs >20000 gènes vs >100000 protéines), la difficulté de leur analyse réside surtout dans la capacité de tous les analyser ensemble, ce qui est limité par les caractéristiques chimiques très différentes de ces « unités fondamentales » du métabolisme.

b) Métabolome

Les études du métabolome présentent en général entre une trentaine à quelques centaines de métabolites parmi des milliers à quelques dizaines de milliers potentiellement présents. Bien plus qu'un catalogue exhaustif des composés présents, l'étude cherche à mettre à jour un mécanisme particulier via un modèle comparatif : a) métabolomique ciblé, s'intéressant à un nombre restreint de composés d'intérêt, b) profil métabolomique, regroupant un certain nombre de métabolites quantifiés de façon absolue ou semi quantitative, connus ou non, et en lien avec une voie métabolique donnée, c) métabolomique non ciblée dans le cas d'une recherche de nouveaux biomarqueurs par exemple.

c) Métabolomique

La fenêtre qu'offre la métabolomique permet donc une analyse compréhensive de l'état physiologique d'un système biologique, à un moment donné et dans son contexte environnemental immédiat, prenant en compte les régulations génétiques, de possibles activités enzymatiques altérées, et des changements de réactions métaboliques. En conséquence, comparé à la génomique ou à la protéomique, la métabolomique reflète des changements de phénotypes et donc de fonction (figure 2).

Les outils utilisés pour ces études ont beaucoup évolué entre les premières investigations et aujourd'hui : la spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier IRTF développé vers 1957, l'absorption UV-visible et la fluorescence, la chromatographie sur couche mince (CCM), la coulométrie, l'électrochimie, la résonance magnétique nucléaire (RMN), la spectrométrie de masse par pyrolyse, l'électrophorèse capillaire couplée à la Spectrométrie de Masse (CE/MS), la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) ou encore la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS) et la spectrométrie de masse à très haute résolution en injection directe avec des analyseurs à Résonance Cyclotronique des Ions à Transformée de Fourier (FT-ICR) [Brown *et al.*, 2005; Aharoni *et al.*, 2002]. Parmi toutes ces méthodes, les plus utilisées à l'heure actuelle sont la RMN, la GC/MS et la LC/MS, qui en plus de permettre des approches chimiométriques, donnent accès à des informations sur les structures chimiques des métabolites, conduisant à leur possible identification afin de les replacer dans un contexte biologique.

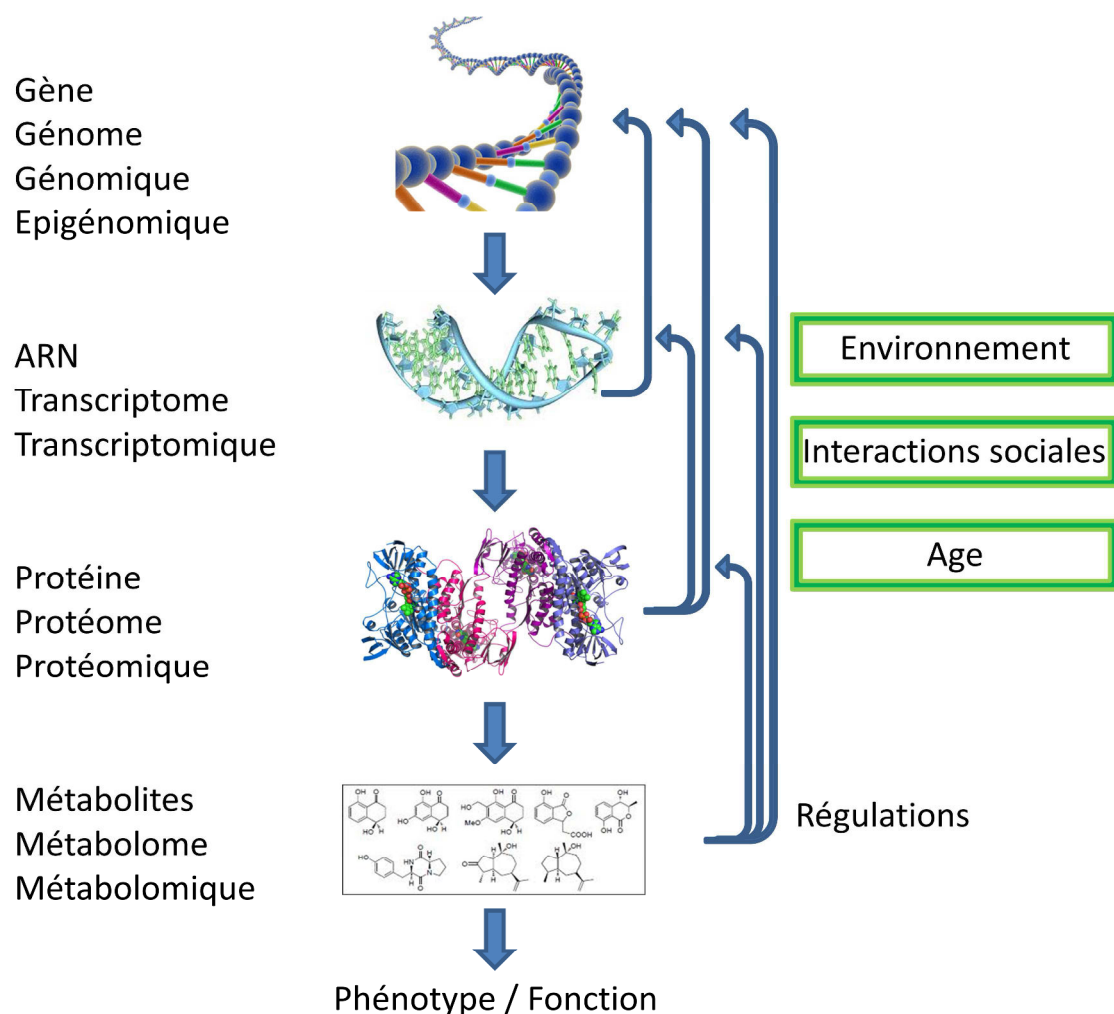


Figure 2 : Représentation schématique des "omiques". 22 000 gènes pour 250 000 à 1 million de protéines estimées

1.2 Métabolisme et cancer

Depuis 15 ans, le métabolisme a un impact considérable en cancérologie (cf infra), en apportant de nouveaux marqueurs et de nouveaux mécanismes. Néanmoins, un lien étroit entre dysfonctionnement métabolique et cancer avait été proposé beaucoup plus tôt. Otto Heinrich Warburg a démontré en 1924 que les cellules tumorales avaient une dépendance au glucose qu'elles convertissent en lactate (glycolyse, habituellement anaérobie) même en présence d'un taux élevé en dioxygène (aérobie). Ce processus de glycolyse « aérobie » est moins rentable en ATP mais il est essentiel à l'activation de certaines voies métaboliques propres à la prolifération cellulaire [Vander Heiden *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2015]. Ce phénotype glycolytique implique, au moins en partie, une activation de la voie PI3K, via la signalisation mTOR et AKT1 et une activation du facteur de transcription HIF-1 [Courtney *et al.*, 2015].

Actuellement, dans l'étude de l' « oncométabolisme », i.e., l'étude des bases métaboliques du cancer, la composante « omique » est d'autant plus importante que le lien entre marqueur et traitement est particulièrement étroit dans le métabolisme – puisque les métabolites sont à la fois des marqueurs et des effecteurs directs (substrats, produits, cofacteurs) dans les mécanismes métaboliques. Nous allons étudier ce lien dans la section suivante.

1.3 Biomarqueurs et cancer

Les biomarqueurs sont des molécules, des mutations génétiques, ou tout autre paramètre biologique permettant, une fois quantifiés ou qualifiés, de différencier les états physiologiques sain, de malade. Ces marqueurs sont couramment utilisés en pratique hospitalière pour le diagnostic de maladies du métabolisme où ils peuvent être surexprimés ou anormalement absents (concentrations en acides organiques, acides aminés par exemple). En effet, lors d'une réaction enzymatique anormale, il peut se produire une accumulation de composé en amont ou un déficit en aval de l'activité enzymatique.

En oncologie, ces biomarqueurs révèlent donc le statut cancéreux du tissu étudié et peuvent permettre le diagnostic du type de cancer rencontré. Ces paramètres peuvent également avoir une valeur pronostique quant au développement futur du cancer, ou encore une valeur informant sur une possible rechute au cours du suivi. Selon le traitement envisagé, il peut renseigner sur la dose optimale pour le patient (donnée pharmacodynamique).

Idéalement, ces biomarqueurs seront présents dans les biofluides faciles d'accès tels que l'urine, le sang ou le sérum. Ces marqueurs du cancer doivent remplir quelques critères de validation tels que :

- être impliqué dans le processus d'apparition du cancer,
- changer de façon corrélée à l'évolution de la maladie,
- avoir un taux significativement différent du taux des patients sains et être mesurables facilement : cette mesure doit être fiable,
- un traitement efficace doit changer le taux du biomarqueur,
- enfin le taux du biomarqueur ne doit pas changer de façon inattendue ou en réponse à d'autres paramètres non liés à un traitement efficace du cancer.

Pour ce qui est des cancers, certains auteurs ont habilement défini des repères (points sensibles) et des caractéristiques propres à l'état tumoral. Ceci présente deux objectifs : la détermination mécanistique de ces processus afin de mieux les comprendre, et la définition de possibles fenêtres thérapeutiques.

1.4 Landmarks et Hallmarks (repères et caractéristiques)

Les travaux de Hanahan portent en partie sur les "landmarks", traduit par "repères" en français. Ces marqueurs correspondent aux points sensibles d'apparition du statut cancéreux (figure 3). Via son article "Rethinking the war on cancer", cet auteur nous invite à comparer les stratégies thérapeutiques anticancéreuses à des stratégies militaires. Il devient alors important de définir autant ses ressources que les forces et la tactique générale de son adversaire (le cancer).

Hanahan et Weinberg présentent une classification des modifications pathologiques considérées comme causales dans l'oncogenèse. Dans leur premier article paru en 2000, ils décrivent 6 classes [Hanahan, Weinberg, 2000]. Elles constituent en même temps : une stratégie de maintien du positionnement (amas cellulaire, tumeur solide), de prise de positions (par prolifération à d'autres organes, tissus), d'acheminement des ressources utiles aux deux précédentes classes (angiogénèse notamment). Dans leur deuxième article de 2011, ils ajoutent 4 classes, dont les altérations du métabolisme (comprenant l'instabilité du génome et les mutations).

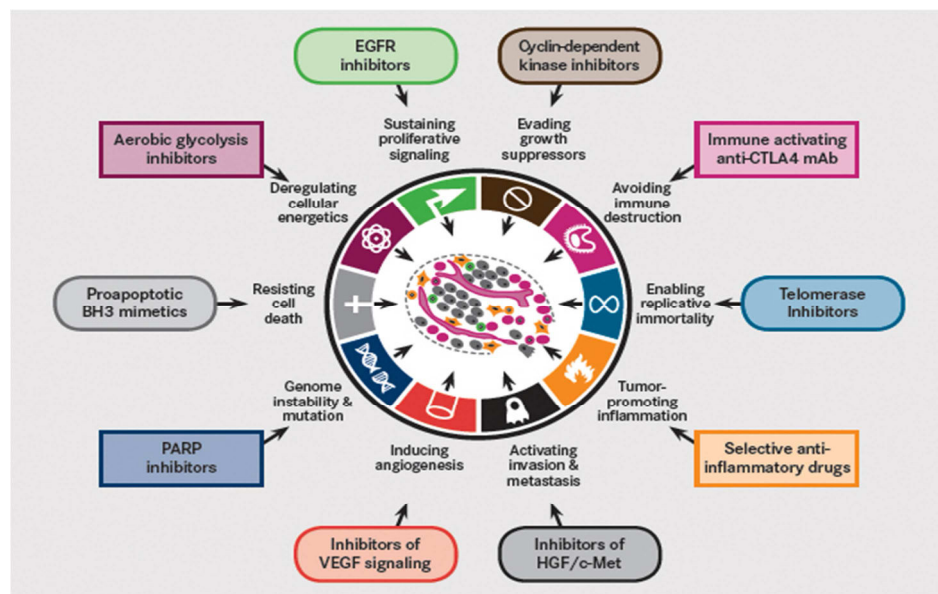


Figure 3 : Stratégies d'attaque en fonction des caractéristiques du développement tumoral.

EGFR : Récepteur épidermal de facteur de croissance, CTLA4 : Antigène cytotoxique associé au lymphocyte T, mAb : Antigène monoclonal, HGF : Facteur de croissance hépatocytaire, VEGF : Facteur de croissance vasculaire endothélial, PARP : polymérase poly(ADP ribose). Source : Hanahan D, Weinberg RA, Hallmarks of cancer, the next generation, *Cell*. [Hanahan, Weinberg, 2011].

Un type de cancer particulier sur lequel j'ai travaillé durant mon doctorat est la leucémie. Ce cancer dit "du sang" touche les cellules souches hématopoïétiques, ce qui crée un déséquilibre du nombre de cellules sanguines fonctionnelles. Plus particulièrement, j'ai étudié une altération du métabolisme (mutation génétique) responsable de la modification de l'activité d'une enzyme du cycle de Krebs qui est l'isocitrate déshydrogénase (IDH). Cette

enzyme est présente au niveau cellulaire sous la forme de 3 isomères (IDH 1, 2 et 3; dont nous verrons les détails plus loin).

1.5 Leucémie Aiguë Myéloïde (LAM)

Le terme de leucémie vient du grecque *leukos* qui signifie "blanc" et de *haima* qui signifie "sang". En cas de leucémie, la production des globules blancs par la moelle osseuse est profondément perturbée. De grandes quantités de cellules anormales sont produites et envahissent la moelle osseuse pour se répandre ensuite dans la circulation sanguine et le système lymphatique. Elles peuvent aussi envahir des organes vitaux. Les leucémies, quelles soient aiguës (les cellules anormales ne parviennent pas à maturité et s'accumulent rapidement) ou chroniques (les cellules anormales parviennent à un relatif degré de maturité et le processus se déroule plus lentement), sont classées en fonction de la lignée hématopoïétique affectée : la lignée lymphocytaire (cellules B productrices des anticorps et cellules T impliquées dans l'immunité à médiation cellulaire) ou la lignée myélocytaire (cellules productrices des globules rouges (transport de l'oxygène), des granulocytes et des monocytes (destruction des bactéries et lutte contre les infections) ou des plaquettes (coagulation du sang en caillot lors d'hémorragies)). Il existe donc des leucémie lymphoblastiques et myéloblastiques. Les Leucémies Aiguës Myéloïdes (LAM) constituent un groupe de proliférations malignes mono- ou oligo-clonales de cellules souches et/ou progéniteurs hématopoïétiques, de génotype hétérogène. Ces clones se caractérisent par la présence d'anomalies chromosomiques (translocations, inversions, amplifications, délétions...) et mutations ponctuelles acquises, non aléatoires et récurrentes, parfois spécifiques d'un sous-type de LAM. Ces anomalies modifient l'expression ou la fonction des gènes qu'elles affectent. Leurs conséquences fonctionnelles peuvent être quantitatives et/ou qualitatives (propriétés dominantes positive ou négative, perte ou gain de fonction). Certaines anomalies sont fondatrices du processus leucémogène (mutation dite "driver"), alors que d'autres, favorisées par l'instabilité génétique et/ou retenues de façon passive par la cellule (mutation dite "passenger") seraient sans effet majeur sur l'initiation de ce processus. Il est maintenant bien établi que l'établissement du phénotype leucémique requière la coopération de plusieurs anomalies génétiques. Indépendamment de leur diversité fonctionnelle (cycle cellulaire, signalisation intracellulaire, régulation génique avec les facteurs de transcription, les modificateurs d'histones et de méthylation de l'ADN et les complexes d'épissage notamment), les produits de ces gènes exercent des activités essentielles pour la survie, la différenciation et la prolifération cellulaire et au cours du développement du système hématopoïétique ; une majorité de ces gènes participe à l'hématopoïèse normale.

Figure 4 de l'hématopoïèse ci-après).

L'avènement des technologies de séquençage à haut débit (RNA-seq, séquençage des régions codantes "whole-exome sequencing") a très largement amélioré notre compréhension des bases moléculaires du développement des LAM chez l'homme, par l'identification des anomalies acquises et constitutionnelles (predisposant à ces pathologies), par l'établissement de profils d'expression génique de sous-populations cellulaires d'intérêt et par la mise en évidence d'une hétérogénéité clonale pouvant contribuer à la résistance aux traitements et à la rechute de la maladie.

La compréhension de ces mécanismes a également pour objectif d'améliorer le pronostic et de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques. Des éléments sur la prise en charge des leucémies sont donnés en annexe 2.

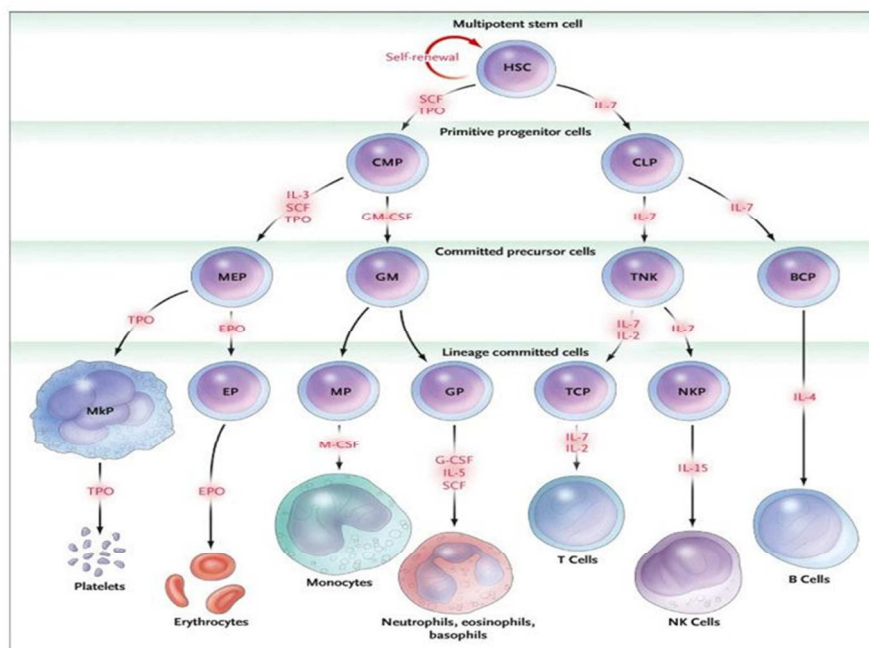


Figure 4 : L'hématopoïèse : développement des cellules sanguines d'un stade souche à fonctionnel. [WS ref5]

2. Mutations des gènes Isocitrate Déshydrogénase

2.1 Tumorigénèse

L'identification de mutations acquises dans les gènes codant pour les enzymes succinate déshydrogénase et fumarate hydratase au début des années 2000, a permis de mettre en évidence la contribution des altérations du métabolisme dans la survenue de certains cancers. Ces enzymes participent au déroulement du cycle de Krebs, une série de réactions qui permet l'oxydation des composés à deux unités de carbone (sous forme d'acétyl-CoA), et donc représente l'étape terminale de dégradation de tous les composés organiques (notamment les sucres, les acides gras, et, d'une manière très finement régulée, les acides

aminés). Un autre groupe d'enzymes du cycle de Krebs a été plus récemment impliqué dans le cancer : les isocitrates déshydrogénases.

Les isocitrates déshydrogénases sont un groupe de trois iso-enzymes ayant les mêmes activités cellulaires mais des localisations et des origines génétiques distinctes. Elles sont appelées IDH1, IDH2 et IDH3. Elles catalysent la conversion de l'isocitrate en alpha-cétoglutarate (α-KG); cette réaction est irréversible et couplée à la production de nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH) pour IDH3, mais réversible et couplée au nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) pour IDH1 et IDH2.

Les gènes codants pour les enzymes IDH sont localisés sur les bandes chromosomiques 2q33 pour IDH1, 15q26 pour IDH2 et 15q25, 20p13 et Xq28 pour les trois sous-unités de IDH3. IDH1 et IDH2 fonctionnent sous la forme d'homodimères, alors que IDH3 s'organise en hétérotétramères (figure 5).

L'isoforme IDH1 est cytosolique et péroxysomale alors que les formes IDH2 et 3 sont mitochondriales. Les enzymes IDH1 et IDH2 ont normalement un rôle protecteur contre différents stress cellulaires (cf. infra), comme les espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou les radiations ionisantes et leur activité augmente en présence de ces stress [Reitman *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2004; Kil *et al.*, 2007]. Allant dans ce sens, l'inhibition de l'activité enzymatique par Knockdown (KO) des gènes *IDH1* et *IDH2* entraîne une augmentation des dommages oxydatifs et augmente la sensibilité des cellules mutées à des agents tels que la staurosporine, alcaloïde suppresseur de tumeur chez la souris [Lee *et al.*, 2009].

Les mutations *IDH* associées au cancer sont hétérozygotes, faux-sens (changement de la nature de l'acide aminé) et somatiques. Ces mutations affectent des acides aminés (figure 5) dont le rôle est crucial au sein du site actif de l'enzyme et par conséquent affectent la fixation de l'α-KG et du NADP.

Les mutations *IDH1* sont généralement portées par le résidu arginine 132 (R132), qui peut être substitué en histidine (H), sérine (S), cystéine (C), glycine (G) ou leucine (L), la mutation la plus fréquente étant la substitution R132H [Yan *et al.*, 2009]. Des mutations *IDH1* R100 ont été identifiées mais restent très rares [Ward *et al.*, 2012].

Dans les gliomes, les mutations affectant *IDH2* sont exclusivement présentes sur le résidu R172, structurellement homologue à la mutation *IDH1* R132. Ce résidu peut être substitué en lysine, glycine, sérine, méthionine (M) et tryptophane (W). Il existe aussi une mutation *IDH2* R140 homologue de la mutation *IDH1* R100 et qui est fréquemment retrouvée dans les LAM mais pas dans les gliomes. Le résidu arginine est alors interchangé avec un acide aminé glutamine ou leucine.

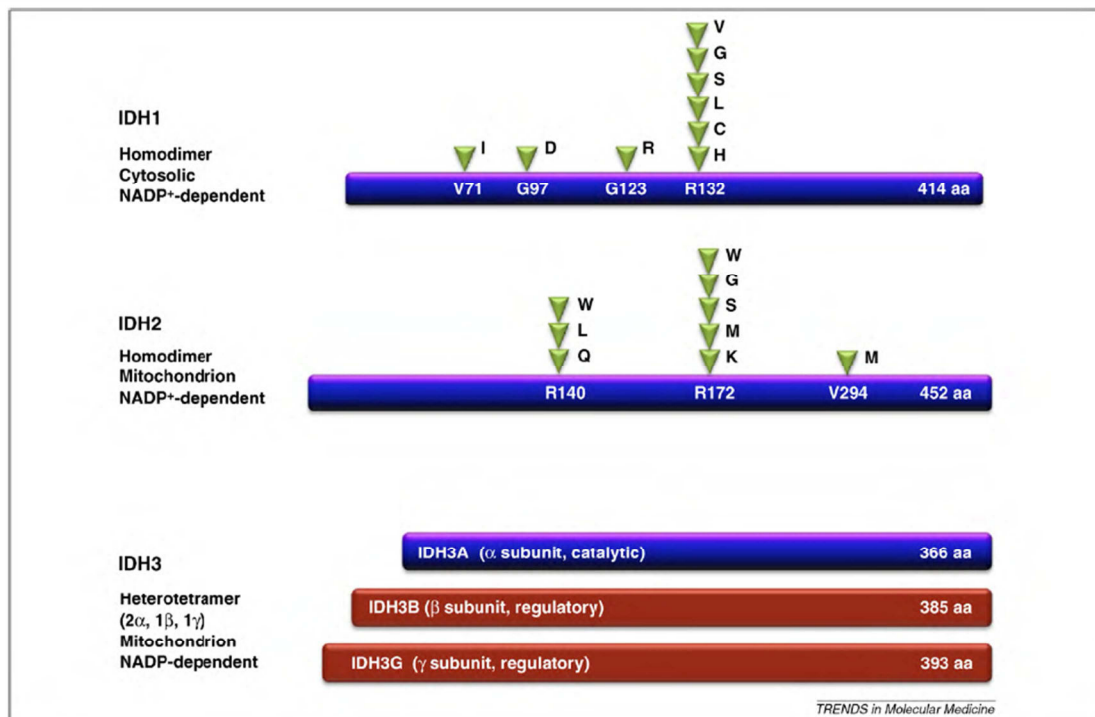


Figure 5 : Résumé des mutations les plus fréquentes des gènes *IDH1* et 2. [Dang L. *et al.*, 2010]

Ces mutations apparaissent dans différents types de cancer, et dans des pourcentages variant beaucoup d'un type à l'autre, comme suit.

a) Prévalence clinique en fonction des tissus affectés

Les mutations des gènes *IDH1/2* ont été successivement identifiés dans des glioblastomes, des gliomes de grades 2 et 3, des LAM, des chondrosarcomes, des cholangiocarcinomes intra hépatiques, divers types d'hémopathies malignes (cf. infra), des mélanomes non épithéliaux, des carcinomes thyroïdiens, des tumeurs du côlon, du sein, et de la prostate.

Le pourcentage de ces mutations au sein des tumeurs va de quelques pourcents pour les paragangliomes ou les carcinomes colorectaux à 75% pour les gliomes et les tumeurs cartilagineuses, en passant par environ 20% pour les LAM (voir tableau 1) [Patel *et al.*, 2012].

Tumor types	Total mutation frequency	IDH1	Mutation number	Percentage (%)	2HG production	IDH2	Mutation number	Percentage (%)	2HG production	Reference
Glioma	75%	R132H	1,705	91.32	Yes	R172K	24	60.00	Yes	5–15, 42
		R132C	76	4.07	Yes	R172M	9	22.50	Yes	
		R132S	31	1.66	Yes	R172W	5	12.50	Yes	
		R132G	35	1.87	Yes	R172G	2	5.00	Yes	
		R132L	18	0.96	Yes					
		R132V	1	0.05	Yes					
		R132P	1	0.05	Yes					
AML	20%	R132H	68	40.00	Yes	R140Q	89	76.72	Yes	16–24 42, 43
		R132C	46	27.06	Yes	R140W	2	1.72	Yes	
		R132S	23	13.53	Yes	R140L	3	2.59	Yes	
		R132G	15	8.82	Yes	R172K	21	18.10	Yes	
		R132L	4	2.35	Yes	R172G	1	0.86	Yes	
		V71I	14	8.24	No					
Cartilaginous tumors	75%	R132C	63	77.78	Yes	R172S	1	100	Yes	27–29, 42
		R132H	14	17.28	Yes					
		R132S	1	1.23	Yes					
		R132G	2	2.47	Yes					
		R132L	1	1.23	Yes					
Thyroid carcinomas	17%	G70D	6	31.58	No					25, 26, 45
		V71I	1	5.26	No					
		I130M	1	5.26	No					
		H133Q	1	5.26	No					
		A134D	2	10.53	No					
		V178I	8	42.11	No					
Cholangiocarcinoma	9/62	R132C	5	62.50	Yes	R172W	1	100	Yes	30, 31, 42
		R132L	2	25.00	Yes					
		R132G	1	12.50	Yes					
		R132H	1	50	Yes					
Prostate cancers	2/79	R132C	1	50	Yes					32, 42
Acute B-lymphoblastic leukemia	1/60	R132C	1	100	Yes					32, 42
Paragangliomas	1/131	R132C	1	100	Yes					33, 42
Colorectal carcinoma	2/180									31, 42
Melanoma	1/78	R132C	1	100	Yes					34, 42

Tableau 1 : Mutations des gènes *IDH* identifiées dans différents types de tumeur. [Yang et al., 2012].

Concernant les hémopathies malignes humaines, les mutations affectant les gènes *IDH1* et *IDH2* ont été décrites chez 8 à 15% des patients porteurs d'une LAM primaire et 22% de patients présentant une LAM secondaire. Leur incidence dans les autres hémopathies est variable : 4-5% dans les syndromes myéloprolifératifs (SMP) et myélodysplasiques (SMD), 4% dans les transformations de leucémie myéloïde chronique (LMC) et jusqu'à 45% dans les lymphomes T angio-immunoblastiques (LAI-T)

Les tumeurs affectées par les mutations *IDH* sont de nature très variée, et les fréquences des mutations sont très variables entre elles et également en fonction du sous-type de tumeur pour chaque tissu.

b) Conversion de l'alpha-cétoglutarate en D-2-hydroxyglutarate : découverte et fonction

Découverte et fonction

L'implication des mutations *IDH1* R132 dans le cancer a été découverte dans les glioblastomes (Echelle de l'OMS) en 2008 [Parsons *et al.*, 2008]. En 2009, une équipe montre la présence d'une mutation du gène *IDH1* en analysant par séquençage complet du génome des échantillons de LAM humaines [Mardis *et al.*, 2009]. D'autres études par la suite ont confirmé la présence de mutation *IDH1* dans les LAM, mais ont également établi la présence de mutations *IDH2* dans ces tumeurs [Yan *et al.*, 2009; Parsons *et al.*, 2008].

En 2009 également, l'équipe de Dang [Dang *et al.*, 2009], en transfectant des lignées cellulaires de glioblastome avec les formes mutée R132H et sauvage du gène *IDH1*, a montré une accumulation de trois dérivés du 2-hydroxyglutarate après analyse de 650 ions en chromatographie liquide et spectrométrie de masse Orbitrap.

Les auteurs ont également montré que le métabolite produit était stéréospécifique, i.e., la forme D (ou R) alors que la forme L (ou S, l'autre stéréoisomère ayant un métabolisme distinct) reste inchangée [MacKenzie *et al.*, 2007; Ward *et al.*, 2004]. En effet, les mutations de ces enzymes au niveau de leur site actif entraînent une néo fonction enzymatique, passant de la décarboxylation oxydative de l'isocitrate en α -KG, à la conversion de l' α -KG en D-2-hydroxyglutarate (D-2-HG) (Figure 6). Le 2-HG est structuellement similaire à l' α -KG, et un groupement hydroxyle remplace un groupement cétone. Le D-2-HG, produit spécifique des formes IDH mutées, agit comme antagoniste des dioxygénases α -KG dépendantes. Un schéma reprenant également les erreurs innées du métabolisme concernant les formes L et D du 2-HG est présenté en annexe 4.

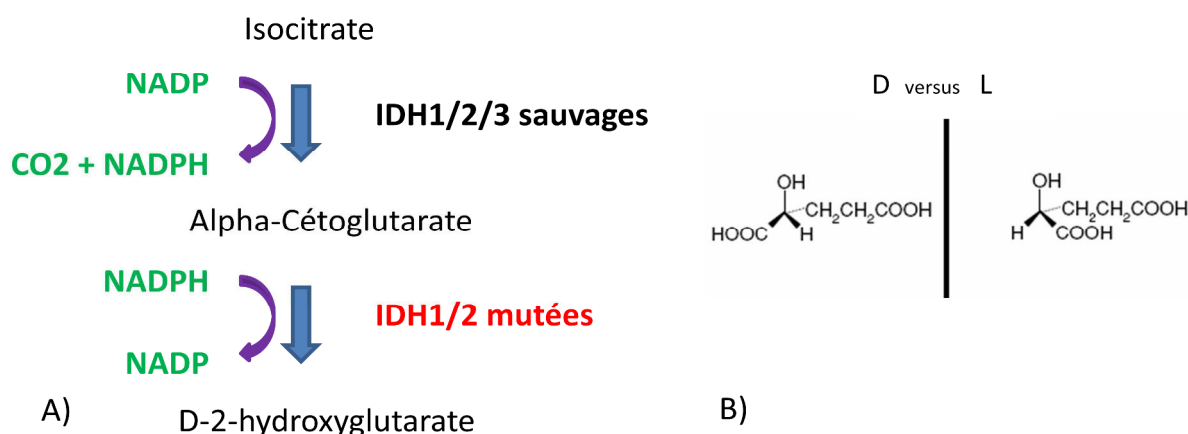


Figure 6 : Néo fonction enzymatique des formes mutées des gènes *IDH1* et 2, A) et les deux stéréoisomères D et L du 2-hydroxyglutarate, B).

L'activité enzymatique des formes sauvages IDH1 et IDH2 mène à la production de NADPH, composé important au niveau cellulaire en agissant dans les voies anaboliques directement comme agent réducteur, via les systèmes glutathion et thioredoxine [Metellus *et al.*, 2001]. L'a-KG possède aussi une fonction d'antioxydant via l'activation de prolyl hydroxylases qui elles-mêmes inactivent la sous-unité HIF-1 alpha. Une déplétion en a-KG peut entraîner donc une augmentation du taux d'HIF-1 alpha et de ses gènes cibles [MacKenzie *et al.*, 2007]. Il a été montré que les cellules souches hématopoïétiques présentent un taux de ROS plus élevé en présence de mutations *IDH1* et 2 [Abdel-Wahab, Levine, 2010], et que ce taux pourrait être impliqué dans la différenciation cellulaire. Il est cependant à noter que des lignées cellulaires HeLa avec une mutation *IDH1* ne montrent pas d'altération significative du taux de ROS, ce taux étant même plus faible dans les tumeurs de souris *NestinCre* knockin *IDH1* R132H [Sasaki *et al.*, 2012]. Il y a donc une discordance entre l'hypothèse d'une altération due à un stress oxydatif par diminution du NADPH et de l'a-KG, qui pourrait expliquer le statut de tumorigénèse, et les résultats *in vivo* qui ne confirment pas entièrement cette idée. En 2015, l'équipe de Chan [Chan *et al.*, 2015] a montré que l'accumulation de D-2-HG entraîne une inhibition du complexe IV de la chaîne de transport des électrons (la protéine COX : cytochrome c oxydase). Il en résulte une sensibilité très accrue des cellules à une inhibition de BCL-2, par l'inhibiteur très spécifique ABT-199.

La découverte que les mutations *IDH* associées au cancer produisent du D-2-HG a permis de rapprocher leur fonctions, de maladies héréditaires du métabolisme connues depuis des décades et associées à ce marqueur. En effet, les différentes maladies métaboliques engendrant une augmentation du taux de 2-HG sont :

- Les acidurie 2-hydroxyglutariques de type L qui touche le cervelet (syndrome cérébelleux) (centre de la coordination des mouvements; mutation au niveau du gène *L2HGDH*), de type D-I (mutation du gène *D2HGDH*) et D-II (mutation *IDH2*) et mixe L et D (mutation du gène *SLC25A1*). Dans le type II, le gène causatif n'a été identifié que suite aux travaux réalisés dans le cancer suggérant *IDH1* et *IDH2* comme candidats [Kranendijk *et al.*, 2010].

- L'acidémie glutarique de type 2 ("déficit multiple des acyl-CoA déshydrogénase") due à une anomalie de l'ETF (electron transfer flavoprotein en anglais) ou de l'ETF déshydrogénase.

- Un déficit du transporteur de citrate SLC25A1 (voies possibles)

- Forme D : Déficit en SSADH (succinic semialdehyde dehydrogenase) ? Acidémie glutarique de type 1 ?
- Mixte : Déficience du complexe IV ? autres ?

- Une augmentation de l'a-KG

Pour le dépistage de ces pathologies, le dosage dans le liquide amniotique peut être réalisé ($N < 7 \mu M$) ; dans le cadre d'un dépistage de cancer associé à une mutation *IDH*, le dosage de 2-HG peut être effectué dans le sérum ou le plasma ($N < 2 \mu M$) et dans le liquide céphalo-rachidien ($N < 3 \mu M$).

Accumulation du D-2-HG

L'accumulation de 2-HG dans les situations de cancer a été initialement démontrée par l'analyse de Dang en 2009 [Dang *et al.*, 2009] puis confirmée par un grand nombre d'études [Ward *et al.*, 2010; Gross *et al.*, 2010]. Le même groupe a tout d'abord donné une confirmation en 2010 et remarqué que cette augmentation est une constante pour tous les échantillons de tumeurs possédant une mutation *IDH1* ou 2. Cependant ces études ont porté sur de petits nombres de patients, et le plus souvent sur du matériel tumoral. Dans le cas des LAM, trois grandes études ont étudié l'accumulation du 2-HG dans des cohortes de patients atteints de LAM, à partir de sérum ou de plasma. Deux d'entre elles, une étude américaine par Dinardo et collaborateurs [Dinardo *et al.*, 2013] et une autre chinoise [Wang JH *et al.*, 2013] publiées en 2013 ont retrouvé une corrélation majeure entre l'accumulation du 2-HG et le génotype muté des tumeurs, mais les auteurs n'ont pas fait la distinction entre les formes D et L. Cela leur a valu une critique musclée de la part des métaboliciens de référence [Struys, 2013]. La troisième étude, la nôtre, a inclus la séparation des deux isomères D et L (voir protocole) sur les sera de 82 patients LAM au diagnostic (mutations *IDH1/2* chez 53 d'entre eux) et 68 patients sans LAM, suivis à l'Institut Gustave Roussy (IGR). Nous avons comparé ces résultats à une cohorte de patients suivis à l'hôpital Necker pour des maladies métaboliques héréditaires. Cela nous a permis de mieux préciser la spécificité et l'importance de l'accumulation du 2-HG dans les LAM dans différentes situations cliniques. Nous avons montré que la distinction des stéréoisomères augmente légèrement la spécificité du test diagnostique, qui néanmoins, reste excellente même sans distinguer les deux formes. Nous avons montré également que la concentration plasmatique de 2-HG à la fin du premier traitement de chimiothérapie a une valeur pronostique significative [Janin *et al.*, 2014; publication insérée dans ce mémoire]. Dans le cadre du pronostic, nous avons trouvé que la distinction des stéréoisomères n'apportait étonnamment pas de valeur ajoutée.

c) Inhibition des dioxygénases α KG-dépendantes

L'accumulation de 2-HG dans les cellules porteuses d'une mutation *IDH1* ou *IDH2* ($\times 100$ - $\times 1000$) dépasse largement les capacités de l'enzyme 2-hydroxyglutarate déshydrogénase (D-2-HGDH) à reverser la réaction ($2\text{-HG} \rightarrow \alpha\text{-KG}$).

Il a été proposé que l'accumulation de D-2-HG dans les cellules porteuses d'une mutation *IDH* inhibe l'activité de dioxygénases [Xu *et al.*, 2011], notamment celles impliquées dans le contrôle épigénétique de l'expression de gènes telles que les membres des familles 5-méthylcytosine hydroxylases Ten-Eleven Translocation (TET1, 2 et 3) et des histones déméthylases JHDM : JmJc contenant un domaine histone déméthylase (KDMs) [Figuerola *et al.*, 2010; Losman, Kaelin, 2013] (figure 7). Ces dioxygénases sont impliquées dans le remodelage de la chromatine : respectivement dans un processus actif de déméthylation de l'ADN (les protéines TET convertissent les résidus 5-méthylcytosines (5mC) en résidus 5-hydroxyméthylcytosines (5hmC)) et dans la déméthylation des résidus lysines (K) des queues d'histones H3. D'autres dioxygénases α -KG dépendantes peuvent être inactivées par l'accumulation de D-2-HG, notamment les hydroxylases P4HA impliquées dans la maturation des collagènes et les prolyl hydroxylases de la famille EglN impliquées dans des processus d'hydroxylation de protéines, comme l'hydroxylation et la dégradation du facteur de transcription HIF-1 α . Le D-2-HG se fixe aux sites de fonction de ces enzymes, agissant comme un inhibiteur compétitif de l' α -KG. En conséquence, les cellules porteuses de mutations *IDH* présentent une hyperméthylation du génome et un profil aberrant de méthylation des histones (enrichissement en marques de répression transcriptionnelle H3K9me3 et H3K27me3), influant sur la transcription. Cette hyperméthylation affecte des régions riches en îlots CpG présents dans les introns et les régions promotrices proximales. Ce phénotype est défini comme « phénotype méthylateur » (CpG island methylator phenotype, CIMP) et a été initialement évoqué pour les gliomes avec mutation *IDH*. Dans le cas des LAM, il est actuellement proposé que ces modifications épigénétiques perturbent l'expression de gènes importants pour l'hématopoïèse et contribuent au blocage de la différenciation des blastes leucémiques [Figuerola *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2012].

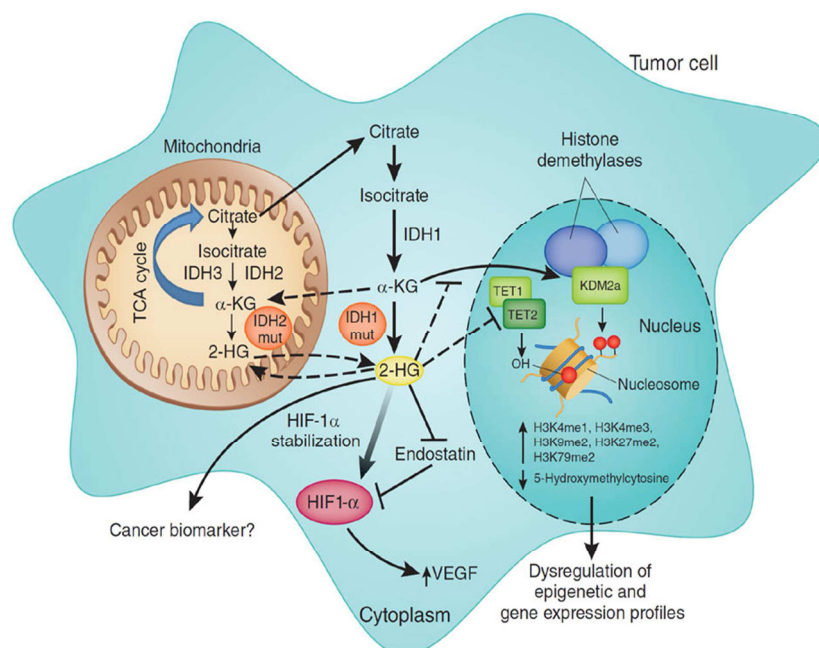


Figure 7 : Influence d'une augmentation de D-2-hydroxyglutarate par mutation des gène *IDH*. [Prensner, Chinnaiyan, 2011].

Les anomalies des gènes *IDH*, *TET2* (essentiellement des pertes de fonction pour *TET2*) et *Wilms tumor 1* (*WT1*, qui a été récemment identifié comme interagissant avec les protéines *TET2/3*) sont souvent mutuellement exclusives dans les LAM et engendrent des profils d'hyperméthylation du génome pour partie semblables [Figueroa *et al.*, 2010]. Les anomalies *IDH*, *TET2* et *WT1* engendrent aussi une diminution en résidus 5hmC dans des régions de régulation distales (enhancers) rendant compte pour partie, du profil d'expression génique de ces cellules mutées.

La dérégulation de l'activité des protéines TET semble particulièrement importante pour la transformation des cellules hématopoïétiques. On peut noter que l'activité des protéines TET est également inhibée par des taux intracellulaires élevés de fumarate ou de succinate, qui sont deux métabolites du cycle de Krebs de structure proche de l' α -KG s'accumulant à la suite d'anomalies dans les gènes *fumarate hydratase* (*FH*, associée aux cancers du rein) ou *succinate déshydrogénase* (*SDH*, tumeurs neuroendocrines). Ces observations illustrent le dialogue étroit entre dysfonction du métabolisme cellulaire et régulation génique (via l'épigenèse) au cours du processus de transformation cellulaire.

d) Mutations *IDH* et autres co-mutations

Tout comme les mutations affectant les gènes *TET2*, *DNA methyltransferase 3A* (*DNMT3A*) ou *additional sex combs like 1* (*ASXL1*), les anomalies *IDH* sont des événements précoces du processus leucémique qui apparaissent dans les cellules souches hématopoïétiques et participent à une dominance du clone leucémique.

Dans le cas des LAM *de novo*, les mutations *IDH* sont plutôt restreintes aux formes à caryotype normal et/ou avec trisomie 8 (dites « cytogénétique intermédiaire ») et souvent associées à des mutations situées dans les gènes *DNMT3A*, impliqué dans la déméthylation de l'ADN, nucléophosmine *NPM1* codant pour une protéine nucléaire aux multiples fonctions et *Fms-like tyrosine kinase 3* (*FLT3*) codant pour un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase relayant l'activité du facteur de croissance Flt3 ligand (FL). Les modalités de coopération entre ces différentes mutations ne sont pas connues.

e) Modèles animaux et cellulaires

Différents modèles sont réalisables pour étudier les mécanismes en jeu dans la survenue des LAM. Aucun modèle cellulaire de lignée myéloïde n'est actuellement disponible dans le commerce, cependant un nombre important d'études présentent des modèles réalisés par génie génétique dans des laboratoires de recherche.

Par exemple, dans la publication de Duncan en 2012 [Duncan *et al.*, 2012], l'équipe a créé une lignée cellulaire *IDH1 R132H* hétérozygote par knockin, ceci à partir d'une lignée

cellulaire de cancer colorectal humain HCT116. Turcan quant à lui utilise des astrocytes primaires humains immortalisés afin de construire des modèles cellulaires pour l'étude de gliomes. Il génère des lignées exprimant le mutant *IDH1* R132H, *IDH1* sauvage ou aucun des deux. Il a montré dans les cellules mutées *IDH1* une altération de marques spécifiques des histones, une hyperméthylation de l'ADN, et d'une façon générale, les mêmes changements phénotypiques au niveau de la méthylation des îlots CpG que les gliomes de bas grade. Supriya Saha a pour sa part démontré le blocage des cellules hépatocytaires progénitrices mutées *IDH1/2* via la production de D-2-HG et la suppression de HNF-4a (Hepatocyte Nuclear Factor A alpha), un régulateur de l'identité des cellules hépatocytaires et de leur quiescence.

Des modèles murins contenant les mutations *IDH1* ou *IDH2* ont été développés par différentes techniques d'intégration de mutation (technique knockin). Les souris knockin *IDH1* R132H [Sasaki *et al.*, 2012 (Nature)], au niveau des cellules hématopoïétiques ou seulement dans la lignée myéloïde, présentent une augmentation du nombre de cellules progénitrices et développent des splénomégalias, une anémie ainsi qu'une hématopoïèse extra-médullaire. Les cellules myéloïdes mutées présentent les mêmes défauts d'hyperméthylation des histones et changement de méthylation de l'ADN que les cellules hématopoïétiques mutées *IDH1* ou 2 des LAM chez les humains. De façon similaire au modèle proposé par Turcan, Rohle transforme des cellules astrocytaires avec la mutation *IDH1* R132H, afin de montrer l'implication de l'enzyme néo-fonctionnelle dans la survenue de gliome, et également de montrer le rôle des inhibiteurs de chez Agios. Il montre ainsi que l'inhibiteur spécifique de cette mutation permet la déméthylation de la marque H3K9me3 et l'expression de gènes associés avec la différenciation des cellules gliales.

L'étude développée par Mylonas et collaborateurs en 2014 [Mylonas *et al.*, 2014; publication insérée dans ma thèse], a utilisé un système de transduction rétrovirale (vecteur rétroviral bi-cistronique recombinant codant pour le cDNA *IDH2* R140Q (Murine Stem Cell Virus (MSCV)-*IDH2* R140Q-IRES GFP) pour exprimer la mutation *IDH2* R140Q dans les cellules primaires souches/progénitrices médullaires de souris (cellules Lineage-negative, Sca1+, c-Kit+ ; LSK) greffées ensuite en souris syngéniques irradiées létalement) afin d'étudier l'activité oncogénique du mutant (voir ci-dessous). Dans ce travail, nous avons montré une pénétrance incomplète de la maladie, à l'image des modèles murins knock-in (KI), puisque seule une partie des souris greffées a développé une prolifération maligne (n=7/20). Parmi ces animaux, nous avons observé des proliférations survenant rapidement de type MPN (n=5) ou des lymphomes matures invasifs d'origine T (n=1) ou B (n=1). Les autres animaux ont développé des proliférations plus tardives de type MDS (n=6/13) dont la période de latence suggère un mécanisme de coopération oncogénique (dont la nature n'est pas connue), à l'instar des modèles murins décrits dans la littérature. La mesure du taux global de résidus 5hmC sur l'ADN génomique extraits d'organes très infiltrés chez les souris malades (moelle et rate) a montré une diminution nette de cette marque épigénétique, confirmant une dysfonction de l'activité des protéines TET dans les contextes transformés

myéloïde et lymphoïde. Nous avons également pu corrélérer le taux de 2-HG sérique à la leucocytose et sévérité de la maladie. Ce modèle est à ce jour le premier modèle murin d'induction d'un syndrome lymphoprolifératif T par une forme mutante *IDH*. La même stratégie rétrovirale a été utilisée par le groupe de Michael Heuser pour l'étude *in vivo* du mutant *IDH1 R132C*, et a montré la nécessité d'une coopération oncogénique entre ce mutant et la surexpression du cDNA *HOXA9* pour l'établissement d'une LAM chez la souris [Chaturvedi *et al.*, 2013]. Chen *et al.*, en 2013 ont montré que la mutation *IDH2* coopère avec les gènes *flt3* ou *Nras* pour le développement de leucémie chez des souris, ceci en impactant le processus de différenciation de cellules de la lignée myéloïde. Dans l'étude de Kats et collaborateurs [Kats *et al.*, 2014], un modèle de souris transgéniques exprimant également la mutation *IDH 2 R140Q* a permis de montrer la collaboration de *IDH2* muté avec la surexpression de *HoxA9* et *Meis1a* et aussi avec des mutations touchant *FLT3*, coopérations conduisant à l'apparition de leucémies aiguës. Ceci souligne le caractère proto-oncogène d'*IDH2* muté. Lu *et al.*, en 2013 ont d'abord séquencé le génome de biopsie de chondrosarcomes afin de montrer une hyperméthylation des îlots CpG. Ces derniers sont riches en gènes impliqués dans des systèmes de différenciation et de lignage cellulaire. Ils ont montré une apparition de sarcomes après injection de cellules mésenchymateuses portant la mutation *IDH2 R172K*. Ces cellules présentaient une hyperméthylation de l'ADN et des défauts de différenciation pouvant être corrigés par des composés hypométhylants. Une équipe s'est intéressée à générer un modèle d'acidurie D-2-hydroxyglutarique, en créant des souris transgéniques mutées *IDH 2 R 140Q* [Akabay *et al.*, 2014]. Les auteurs ont observé des symptômes similaires (dysmorphie, cardiomyopathie, anomalies comportementales) à ceux développés chez l'humain, et ils ont aussi montré que l'inhibition spécifique de l'enzyme mutée rétablit la fonction cardiaque de ces souris, démontrant ainsi la possibilité d'usage des inhibiteurs pharmacologiques chez ces patients aciduriques.

2.2 Intérêt diagnostique

La méthode couramment utilisée pour la détection des mutations *IDH* consiste en une analyse de la séquence nucléotidique, ou séquençage de l'ADN des cellules ou tissus prélevés. Cette méthode est longue, coûteuse, et ne permet pas de définir le statut phénotypique de l'individu mais seulement l'éventuelle présence des mutations.

Beaucoup d'efforts sont menés en médecine afin d'augmenter la vitesse de diagnostic d'une maladie afin de prendre en charge le plus tôt possible le patient. De plus, nous cherchons à augmenter la fiabilité des tests tout en réduisant les coûts. Dans cet optique, la recherche de biomarqueurs s'avère très utile, surtout si le tissu ou le fluide dans lequel il se trouve est facilement accessible.

Dans le papier de Horbinski de 2009, les auteurs décrivent une méthode PCR (Polymerase chain reaction ou réaction en chaîne par polymérase) afin de détecter les deux mutations les plus fréquentes : *IDH1 R132* et *IDH2 R172* après avoir fixé les biopsies de tissu tumoral à l'aide de formaline [Horbinski *et al.*, 2009]. Les tumeurs solides constituent un environnement particulier, qui ne permet pas toujours la recherche de biomarqueurs sanguins par exemple. Dans ce cas, une biopsie est pratiquée et un diagnostic moléculaire est réalisé, mais un dosage des stéréoisomères est également possible. D'autres auteurs ont développé cette technique PCR pour 12 mutations *IDH1* et 2 dans des gliomes [Catteau *et al.*, 2014], technique en une étape qui s'est révélée robuste et rapide. Ce genre de technique peut par la suite être intéressante dans le cadre du diagnostic, mais aussi de la sélection de patients pour des tests cliniques par exemple.

Pour étudier la corrélation des diagnostics entre différents laboratoires, Van Den Bent a demandé à six laboratoires de détecter le statut mutationnel *IDH* sur 31 coupes de gliomes fixés par FFPE (formalin-fixed parafin-embedded) [Van Den Bent *et al.*, 2013]. Tous ces laboratoires utilisent leur méthode standard de diagnostic qui se base tout d'abord sur un test immunohistochimique (IHC) pour la mutation *IDH1 R132H*, la plus fréquente, suivi d'un séquençage génétique pour les échantillons négatifs de prime abord [Preusser *et al.*, 2011].

Pour ce qui est des LAM, l'équipe de Ashraf [Ashraf *et al.*, 2013] a mis au point une méthode PCR appelée ASO-PCR pour allèle-spécifique oligonucléotide-PCR permettant de détecter les mutations *IDH2* qui sont généralement repérées par séquençage ADN. Ils ont identifié 22 mutations *IDH2* parmi 120 échantillons de patients, mutations confirmées ensuite par séquençage. D'autres techniques de séquençage profond sur amplicons *IDH* spécifiques (méthodologies Illumina, Ion Torrent, Fluidigm, PCR digitale etc...) sont actuellement utilisées en routine pour le diagnostic de ces mutations dans les pathologies tumorales.

Par ailleurs, le dosage du biomarqueur D-2-HG est un test simple pour ce qui est des patients atteints de leucémies, puisque les sérums et/ou plasmas dans lesquels le métabolite s'accumule, sont facilement accessibles.

2.3 Traitements

Le traitement standard pour les patients leucémiques est composé de deux molécules : un dérivé anthracyclinique et la cytarabine (WS ref 2; voir également l'annexe 2 / c) Traitements). L'avènement des techniques de NGS et la caractérisation des anomalies moléculaires caractérisant les LAM ont encouragé le développement de nouvelles thérapies, ciblant spécifiquement ces anomalies.

La société pharmaceutique américaine (AGIOS Pharmaceuticals, Boston, MA, USA), a récemment mis au point des petites molécules ciblant les formes mutantes *IDH* : un

inhibiteur des formes mutées IDH1 (composé AG-120) et IDH2 (composé AGI-6780/AG-221 ; et d'autres sont en développement). Ces composés sont des inhibiteurs allostériques non-compétitifs se fixant hors du site catalytique de l'enzyme; ils maintiennent les homo-dimères IDH mutés et hétéro-dimères IDH muté/natif dans une conformation ouverte incompatible avec la catalyse de l' α -KG en 2-HG. En conséquence, ils entraînent une diminution du taux de D-2-HG dans les cellules porteuses de mutation *IDH*. Il a été montré que la mise en culture de cellules primaires de LAM avec mutation *IDH2 R140Q* en présence d'AGI-6780, après une étape transitoire de prolifération, induit une augmentation de l'expression de marqueurs membranaires et intracellulaire signant un engagement vers la différenciation myélo-monocytaire et/ou granulocytaire. Cet effet s'accompagne d'un retour du niveau de D-2HG intracellulaire à des niveaux physiologiques et n'est observable que dans le cas d'échantillons leucémiques porteurs de la mutation [Wang F *et al.*, 2013]. D'autres lignées cellulaires et cellules primaires de nature non hématopoïétique (astrocytaires, adipocytaires, neuronales..) ont également établi le caractère réversible du blocage de la différenciation induit par les anomalies *IDH* en présence de ces molécules [Reitman *et al.*, 2011; Garrett-Bakelman, Melnick, 2013; Rohle *et al.*, 2013]. Ces travaux dans leur ensemble ont apporté la preuve de concept de l'efficacité de ces inhibiteurs pharmacologiques et ont permis le dépôt de candidatures de ces molécules à l'état d'investigation (Investigational New Drug Application, IND) par la société AGIOS. Ces inhibiteurs font actuellement l'objet d'essais cliniques de phase 1 dans différents centres, dont un au niveau européen réalisé au sein de l'Institut Gustave Roussy (Investigateur principal : Dr Stéphane De Botton ; Villejuif, France).

Deux études récentes ont ouvert la voie à d'autres options thérapeutiques en montrant une dépendance des cellules mutées *IDH* à l'activité anti-apoptotique de la protéine BCL2 [Chan *et al.*, 2015] et à l'activité de la protéine BRD4 [Chen *et al.*, 2013] (utilisation des composés ABT-199 bloquant l'activité BCL2 et JQ1 bloquant l'activité de la protéine BRD4, tous les deux actuellement proposés en clinique pour certaines hémopathies et LAM). Ces exemples illustrent le fait qu'il existe des mécanismes de coopération oncogénique (BRD4) et de létalité synthétique (BCL2) liés aux anomalies *IDH* qui peuvent être des cibles thérapeutiques intéressantes dans le contexte de ces mutations.

MES TRAVAUX

Mon travail de doctorat s'est déroulé autour de deux axes principaux:

1. le développement technologique et méthodologique en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC MS),
2. leur application sur des échantillons biologiques et des cultures cellulaires.

Le premier développement technologique fut la mise au point de la séparation de stéréoisomères par dérivation chirale dans de petites quantités de matériel biologique, ceci permettant notamment l'étude des deux isomères D et L (Dextrogyre et Lévo-gyre

respectivement) du 2-HG dans le cadre de l'étude des mutations *IDH* chez les patients atteints de LAM (1.). L'établissement de bibliothèques de signatures spectrales de métabolites a permis l'étude des profils métabolomiques des patients atteints d'hémopathologies et de tumeurs reliées aux mutations de gènes impliqués dans la traduction d'enzymes du cycle de Krebs (*IDH* et *SDH* principalement).

J'ai étudié les effets d'un inhibiteur dirigé contre les formes mutées *IDH2* (*IDH2 R140Q* et *IDH2 R172K*) actuellement utilisé en clinique pour le traitement de LAM avec mutation *IDH2*, sur des cultures de fibroblastes primaires issus d'un patient possédant la même mutation mais acquise au niveau germinale, ce qui se traduit chez lui par une acidurie D-2-hydroxyglutarique. Ce déficit métabolique entraîne entre autres des anomalies neurologiques et une cardiopathie. Ce travail m'a permis de confirmer les propriétés d'inhibition de ce composé sur l'enzyme *IDH* mutée et d'observer des effets secondaires au niveau du métabolisme des lipides et du cycle de Krebs (2.).

Par ailleurs, nous avons étendu l'analyse des profils métaboliques associés aux mutations affectant la succinate déshydrogénase (*SDH*), autre enzyme du cycle de Krebs impliquée dans des mécanismes de tumorigénèse (3.).

Enfin la mise au point de méthodes analytiques en spectrométrie de masse en tandem permet d'accroître la sensibilité et la spécificité des analyses en routine hospitalière, et des méthodes d'analyse de flux métabolique ont également été mises au point par la même technique (4.). Je vais détailler ces travaux dans les sections suivantes.

1. Production de l'oncométabolite D-2-hydroxyglutarate dans les hémopathies malignes avec mutations *IDH 1/2*

1.1 Contexte

Dans cette première partie, je vous présente la séparation des stéréoisomères D et L du 2-hydroxyglutarate. Nous avons vu précédemment que seul le taux de la forme D du 2-HG est impacté par les mutations des gènes *IDH*. En condition physiologique, les deux stéréoisomères ont un ratio D/L proche de 1 (0,65 μ M de la forme D dans le sang versus 0,75 μ M pour la forme L (HMDB)). Comme le taux de L-2-HG ne varie pas en fonction de la mutation, le ratio D/L sera donc un indicateur d'une possible mutation si celui-ci augmente. La concentration du stéréoisomère D seul est évidemment informative, mais elle nécessite une quantification absolue, ce qui signifie, en pratique, qu'elle doit être rapportée à un étalon exogène rajouté lors du dosage. Cela peut introduire une source de variation technique, alors que le rapport direct entre les formes D et L ne dépend pas de l'étalon.

Dans le cas de l'étude conduite sur la cohorte de patients atteints de LAM avec mutation *IDH*, le travail a été réalisé en collaboration avec les Drs Stéphane de Botton et Virginie Penard-Lacronique (unité INSERM U1170, Institut Gustave Roussy). Les échantillons analysés

lors de cette étude ont été collectés sur plusieurs centres en France (IGR, Lille, Créteil, Dijon, Paris) grâce au réseau français des Leucémies Aiguës (ALFA, Acute Leukemia French Association). Dans le cas des maladies héréditaires, les échantillons ont été collectés par le biais du Centre de Référence des Maladies Métaboliques de l'hôpital Necker (Directrice : Pascale de Lonlay).

1.2 Objectifs

Le but de ce travail était d'une part de différencier les stéréo-isomères D et L du 2-HG afin de les quantifier séparément étant donné l'absence de lien entre les mutations *IDH* et le L-2-HG. D'autre part, le but était d'évaluer la valeur diagnostique du taux du D-2-HG seul puis de comparer l'efficacité de ce paramètre face au dosage du 2-HG total (D+L). De plus, nous nous sommes intéressés à la valeur prédictive du taux de 2-HG et du rapport des stéréoisomères D/L quant à la présence des mutations *IDH* 1/2. Enfin, nous avons comparé le biomarqueur qu'est le taux sérique ou plasmatique de D-2-HG aux marqueurs moléculaires classiquement utilisés pour le suivi de la maladie.

1.3 Technique de séparation et de quantification du D-2-HG

Les stéréoisomères D et L du 2-HG sont deux composés de structure très similaire, mais qui ont des origines et des actions distinctes. De ce fait, il nous a paru important de faire la distinction analytique entre ces deux molécules. Des défauts du métabolisme peuvent affecter les deux formes (aciduries D ou L -2-hydroxyglutarique, déficit de transport du citrate entre autres). En routine hospitalière, ceci se traduit parfois par la nécessité de séparer les deux stéréoisomères.

Les résultats de notre étude (cf copie de l'article joint), réalisée dans une large cohorte de patients leucémiques, démontrent que le dosage du 2-HG total (somme du D+L) est suffisant pour distinguer les patients atteints d'une mutation affectant un gène *IDH*, cependant, la quantification doit être robuste. L'avantage certain de la séparation des stéréoisomères réside dans la possibilité d'utiliser le ratio D/L (limite à 2µM pour le total et 2,5 pour le ratio pour détecter les mutations *IDH*1/2 à la meilleure spécificité avec 100% de sensibilité). En effet, il n'est alors plus nécessaire de quantifier le 2-HG total pour obtenir le statut mutationnel du patient. D'autre part, ceci permet de faire la distinction entre un certain type de défaut du métabolisme qui entraîne l'augmentation des deux stéréoisomères et ces LAM pour lesquelles seulement le D-2-HG augmente.

Préparation des échantillons et analyse par GC tandem-MS

Le biomarqueur d'intérêt qu'est le D-2-HG doit tout d'abord être extrait du fluide complexe que constitue le sérum. La partie pré-analytique consiste donc à extraire les acides

organiques et autres composés polaires par une extraction liquide/liquide (car faisant intervenir deux liquides non miscibles entre eux) à l'acétate d'éthyle sur un volume constant de 100µL de sérum, suivie d'une dérivation des fonctions hydroxyles et amines par butylation et acétylation (annexe 6). Cette technique est dite de dérivation chirale des composés (permettant la séparation des stéréoisomères).

Voici ci-après les chromatogrammes des pics L et D du 2-HG naturels et marqués par carbone 13 ($^{13}\text{C}_4$: 4 carbones isotopiques).

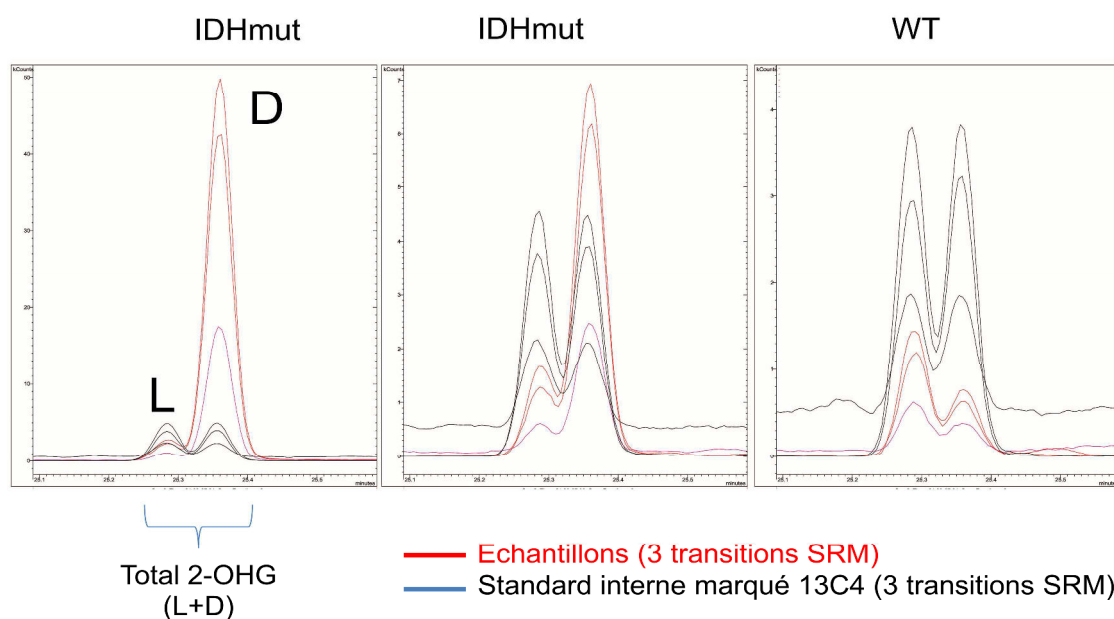


Figure 8 : Chromatogrammes obtenus pour deux patients avec mutation *IDH1/2* et un patient sans mutation.

Par cette technique, il est facile, rapide et peu cher, de faire le ratio D/L des deux stéréoisomères afin d'avoir le statut mutationnel du patient atteint de LAM (cut-off de 2.5). Par ailleurs, ce ratio permet de s'affranchir du dosage du 2-HG total via l'étalon interne.

Quantification

Calcul de la concentration en L/D-2-HG ^{12}C :

Formule :

$$\text{L/D-2-HG } ^{12}\text{C} = \frac{\text{Aire } ^{12}\text{C L} + \text{Aire } ^{12}\text{C D}}{\text{Aire } ^{13}\text{C}_4 \text{ L} + \text{Aire } ^{13}\text{C}_4 \text{ D}} \times E^{-13}\text{C}_4$$

$E\text{-}^{13}\text{C}_4$ = quantité d'étalon 2-HG $^{13}\text{C}_4$ rajoutée à l'échantillon.

Pour visualiser le 2-HG, nous avons dérivé des transitions MRM (Multiple Reaction Monitoring) spécifiques en nous basant sur les travaux originels décrivant les techniques de dosage du 2-HG en GC-MS ou LC-MS/MS [Duran *et al.*, 1980].

Du fait de la nouvelle technique de détection en GC-MS/MS (GC-tandem MS), nous avons déterminé quels ions sont les plus sensibles et spécifiques dans ce contexte (trois transitions pour la molécule naturelle et trois transitions pour l'étalon marqué au $^{13}\text{C}_4$) :

Une transition correspond au passage d'un ion parent sélectionné par le premier quadripôle à un ion fils sélectionné au niveau du troisième quadripôle après fragmentation dans le second quadripôle par collision avec l'argon.

Transitions pour le composé naturel (U- ^{12}C)	Transitions pour l'étalon interne ($^{13}\text{C}_4$)
145>85	148>88
173>85	177>88
173>131	177>135

Tableau 2 : Transitions MRM du 2-HG naturel et marqué $^{13}\text{C}_4$

Les ions produits (fils) des transitions 173>85 et 177>88 (respectivement 85 et 88) sont utilisés comme *quantifieurs*, les autres comme *qualifieurs*.

Ces transitions sont appariées de manière à quantifier des ions de structure équivalente (malgré le poids moléculaire différent, qui en assure la discrimination et donc la quantification de l'un par rapport à l'autre), et cela à la fois pour les ions précurseurs et les ions produits (par exemple le 177 vs 173, et 88 vs 85). Le choix d'une structure équivalente maximise la ressemblance des caractéristiques analytiques entre l'étalon et le composé naturel.

A noter que ces transitions ne sont pas publiées, car nous sommes vraisemblablement les premiers à utiliser une GC-tandem MS pour ce dosage. D'autre part, ces transitions ne sont pas simples à identifier, car le 2-hydroxyglutarate génère beaucoup d'ions déjà lors de la première étape d'impact électronique (voir annexe 10), et des ions différents ont été décrits comme étant majoritaires, minoritaires ou absents dans les deux publications présentant la technique en GC-MS [Duran *et al.*, 1980; Gibson *et al.*, 1993]. Les ions obtenus avec les techniques en LC-MS sont différents du fait de l'utilisation d'une technique de dérivation différente [Struys *et al.*, 2004]. De plus certains ions subissent vraisemblablement des réarrangements intra- et/ou intermoléculaires lors de la fragmentation dans le spectromètre de masse. Ainsi une étape empirique de validation a été absolument indispensable pour obtenir ces paramètres. D'autre part, la tandem MS (double fragmentation dans le cadre de

la GC) a été nécessaire car une simple fragmentation en mode SIM (single ion monitoring) montrait de nombreuses interférences.

Nous avons validé la méthode en montrant un excellent caractère de répétabilité, reproductibilité, et une sensibilité meilleure que les techniques publiées (limite de quantification < 1 picomoles).

La quantité d'étalon interne est bien entendu à ajuster en fonction des concentrations attendues. Pour 100 µL de plasma, nous utilisons une concentration de 0.35 nmoles.

1.4 Publications

La publication correspondante est parue dans la revue internationale *Journal of Clinical Oncology* (JCO) [Janin *et al.*, 2014]. J'y associe également une publication dans laquelle j'ai appliqué les mêmes techniques pour la caractérisation d'un modèle murin d'hémopathies malignes liées aux mutations *IDH* [Mylonas *et al.* 2014].

Serum 2-Hydroxyglutarate Production in *IDH1*- and *IDH2*-Mutated De Novo Acute Myeloid Leukemia: A Study by the Acute Leukemia French Association Group

Maxime Janin, Elena Mylonas, Véronique Saada, Jean-Baptiste Micol, Aline Renneville, Cyril Quivoron, Serge Koscielny, Laurianne Scourzic, Sébastien Forget, Cécile Pautas, Denis Caillot, Claude Preudhomme, Hervé Dombret, Céline Berthon, Robert Barouki, Daniel Rabier, Nathalie Auger, Frank Griscelli, Elisabeth Chachaty, Edwige Leclercq, Marie-Hélène Courtier, Annelise Bennaceur-Griscelli, Eric Solary, Olivier Adrien Bernard, Virginie Penard-Lacronique, Chris Ottolenghi, and Stéphane de Botton

Author affiliations appear at the end of this article.

Published online ahead of print at www.jco.org on December 16, 2013.

Supported in part by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), by the Institut National du Cancer (INCa 2012-1-RT-09 and INCa-DGOS-Inserm 6043) and by the association Laurette Fugain (to Virginie Penard-Lacronique and Stéphane de Botton). Elena Mylonas was supported by a CDI-Mission (Institut Gustave Roussy).

M.J., E.M., V.S., and J.-B.M. contributed equally to this work; V.P.-L., C.O., and S.d.B. shared senior authorship.

Authors' disclosures of potential conflicts of interest and author contributions are found at the end of this article.

Corresponding author: Stéphane de Botton, MD, PhD, Hématologie Clinique, Institut Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif, France; e-mail: stephane.debotton@igr.fr.

© 2013 by American Society of Clinical Oncology

0732-183X/14/3204w-297w/\$20.00

DOI: 10.1200/JCO.2013.50.2047

ABSTRACT

Purpose

Mutated isocitrate dehydrogenases (IDHs) 1 and 2 produce high levels of 2-hydroxyglutarate (2-HG). We investigated whether, in acute myeloid leukemia (AML), serum 2-HG would predict the presence of *IDH1/2* mutations at diagnosis and provide a marker of minimal residual disease (MRD).

Patients and Methods

Serum samples from 82 patients at diagnosis of de novo AML (*IDH1/2* mutated, $n = 53$) and 68 patients without AML were analyzed for total 2-HG and its ratio of D to L stereoisomers by mass spectrometry. We measured 2-HG levels and molecular markers of MRD (*WT1* and *NPM1*) in serial samples of 36 patients with *IDH1/2* mutations after induction therapy.

Results

In patients with AML with *IDH1/2* mutations, 2-HG serum levels were significantly higher than in patients with *IDH1/2* wild type ($P < .001$). Area under the receiver operating characteristic curve was 99%. The optimum diagnostic cutoff between *IDH1/2* mutated and normal was 2 $\mu\text{mol/L}$ (sensitivity, 100%; specificity, 79%). Quantification of the D/L stereoisomers increased specificity (100%; 95% CI, 83% to 100%) compared with total 2-HG ($P = .031$). In patients with *IDH2* R172 mutations, 2-HG levels were higher relative to those with other *IDH1/2* mutations ($P < .05$). During follow-up, serum 2-HG levels showed strong positive correlation with *WT1* and *NPM1* ($P < .001$). After induction therapy, total 2-HG serum levels $< 2 \mu\text{mol/L}$ were associated with better overall ($P = .008$) and disease-free survival ($P = .005$).

Conclusion

Serum 2-HG is a predictor of the presence of *IDH1/2* mutations and outcome in these patients. Discrimination between D/L stereoisomers improved specificity.

J Clin Oncol 32:297-305. © 2013 by American Society of Clinical Oncology

INTRODUCTION

Mutations in the isocitrate dehydrogenase (IDH) *IDH1* and *IDH2* genes revealed a novel mechanism of cancer formation and uncovered new therapeutic opportunities. These enzymes normally catalyze a Krebs cycle–like reaction, namely the conversion of isocitrate to alpha-ketoglutarate (aKG) coupled with NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) production, which is essential for oxidative stress response and several metabolic pathways. Mutated IDH enzymes produce the D stereoisomer of 2-hydroxyglutarate (2-HG) from aKG.¹ As a result, tumor cells accumulate massive amounts of 2-HG, which can interfere with aKG-dependent di-

oxygenases, including histone and DNA demethylases, such as TET2.²⁻⁴ In vitro data and a mouse model concurrently indicated that in hematopoietic cells, *IDH1/2* mutations lead to major alterations of epigenetic marks throughout the genome.^{5,6} *IDH1/2* mutations are found in 15% to 20% of patients with AML ($\leq 30\%$ in patients with normal karyotype).⁷⁻⁹ *IDH1/2* mutations are thought to be an early oncogenic event in AML.¹⁰ The clinical impact of these mutations may depend on the specific mutation (eg, *IDH2* R140, R132, or R172) and on the presence of associated mutations, such as *FLT3* internal tandem duplication (*FLT3-ITD*) or *NPM1*.^{8,11-13} Detection of *IDH1/2* mutations and quantitation of 2-HG in blood may therefore

provide markers proximal to the mechanism of disease, which could help to optimize treatment and follow-up of this subset of AML. Several studies have shown increased levels of total serum 2-HG in small cohorts of patients with AML with *IDH1/2* mutations,¹⁴⁻¹⁹ but none have investigated long-term follow-up or measured the specific product of the mutated enzymes (ie, D stereoisomer *v* unrelated (L) stereoisomer of 2-HG).

We measured levels of total 2-HG (ie, sum of D and L stereoisomers) and the ratio between the two stereoisomers (D to L) in serum or plasma from a cohort of 82 patients with de novo AML and 68 patients without AML. We tested the diagnostic value of these two markers to identify *IDH1/2* mutations as well as their prognostic significance and whether they correlated with known minimal residual disease (MRD) markers.

PATIENTS AND METHODS

Study Population and Data Collection

Serum or plasma samples from 150 patients with (*n* = 82) and without AML (*n* = 68) were analyzed for 2-HG levels (Fig 1). Among those with AML, 53 had *IDH1/2* mutations, and 29 consecutive patients were *IDH1/2* wild type. Samples from patients with AML were collected at diagnosis between 2005 and 2012 through a collaborative network of French centers (Creteil, Dijon, Lille, Paris Saint Louis, and Villejuif) for the Acute Leukemia French Association (ALFA) group. All patients were investigated for *IDH1*, *IDH2*, *AML1/RUNX1*, *CEBPA*, *FLT3*, and *NPM1* mutations as described.¹¹ They all had intermediate-risk cytogenetics (except one because of karyotype failure), but the cohort was enriched in *IDH1/2*-mutated patients. Fifty-two patients were included in the ALFA-0701²⁰ and -0702 trials (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00932412). Thirty patients received intensive treatment according to ALFA protocols, combining anthracyclines and cytarabine.^{21,22} All patients signed written informed consent.

For follow-up studies, we analyzed 171 serum or plasma samples from 36 patients with AML with *IDH1/2* mutations (at diagnosis, in complete remission [CR], or with refractory disease) after consolidation courses, during follow-up, and at relapse. Serums were analyzed along with molecular markers of MRD (*NPM1* mutation, *WT1* expression) as reported.^{23,24} MRD levels were assessed using cDNA-based real-time quantitative polymerase chain reaction

(PCR) and reported as the ratio of *NPM1* mutation or *WT1* transcript to 100 *ABL* transcript. *WT1* overexpression at diagnosis was defined as a ratio of *WT1* to *ABL* transcript > 25% in bone marrow (BM) or 5% in peripheral blood (PB) samples. Samples were collected at diagnosis, after induction, after consolidation course, during follow-up, and at relapse.

2-HG measurements in plasma samples of the 68 patients without AML were analyzed per routine diagnostic procedure at the Necker Hospital (Paris, France) for the workup of 50 consecutive patients with putative metabolic disorders and then bidirectionally sequenced on Ion Torrent Sequencer. The relative *IDH1/2* mutational burden was determined as number of normal to mutant reads.

Quantification of *IDH1/2* Mutation Burden

Genomic DNA was extracted from BM or PB samples using conventional procedures. *IDH1*- (codon R132) and *IDH2*-targeted (codons R140 and R172) regions were amplified by PCR with primers (available on request) containing Ion Torrent (Life Technologies, Carlsbad, CA) adapters and unique barcodes to generate libraries. Pooled amplicon libraries were clonally amplified on Ion Spheres using the Ion Xpress Template 200 Kit (Life Technologies) and then bidirectionally sequenced on Ion Torrent Sequencer. The relative *IDH1/2* mutational burden was determined as number of normal to mutant reads.

2-HG Analysis

Plasma or serum samples (dry lithium heparin) from the reference population (*n* = 68) and patients with AML (*n* = 82) were analyzed in the Reference Center for Metabolic Disorders at Necker Hospital. To each 100- μ L sample we added 0.5 nmoles of 1,2,3,4-¹³C₄-labeled 2-HG, prepared by reduction of labeled aKG (Eurisotop, Saint-Aubin, France) as the internal standard. Analysis was performed in selected-reaction monitoring mode by gas chromatography–tandem mass spectrometry on a GC 450/300-MS triple quadrupole (Varian, Br  ker Daltonics, Fremont, CA). Sample processing was performed as reported.²⁵ Calibration curves were linear between < 20 pmoles and > 400 nmoles. The limit of quantification was 50 pmoles, with a coefficient of variation < 10%. The laboratory participates in the International External Quality Assurance Programme for Quantitative Organic Acids (<http://cms.erndimqa.nl/>).

Statistical Analysis

Analyses were performed using the SAS software (version 9.2; SAS Institute, Cary, NC) and R language–based software (version 2.14; (<http://www.r-project.org>)). Area under the receiver operating characteristic curve (ROC

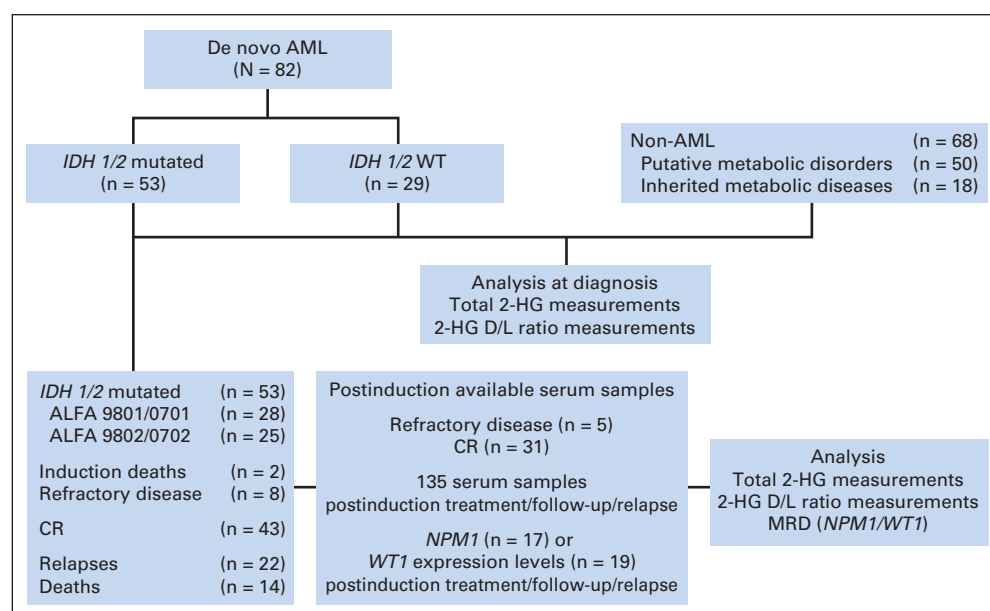


Fig 1. CONSORT diagram. 2-HG, D and L stereoisomers of 2-hydroxyglutarate; ALFA, Acute Leukemia French Association; AML, acute myeloid leukemia; CR, complete remission; MRD, minimal residual disease; WT, wild type.

AUC) was estimated using the *pROC* package (R software; 95% CIs estimated using de Long method). Correlations between 2-HG and hematologic parameters or molecular markers of follow-up were estimated with Spearman rank-order correlation coefficient. Progression-free survival (PFS) was estimated for patients in CR from the date of diagnosis to date of progression. Patients who died without progression were considered censored at the date of death. The Kaplan-Meier method was used to perform univariate survival analyses; the log-rank test was used to test statistical significance. Cox regression analysis was performed to identify independent prognostic parameters. All *P* values were two tailed, and the level of significance was *P* < .05.

RESULTS

IDH1/2 Gene Mutation Profile in the Study Population

Initial characteristics of 82 patients with de novo AML are summarized in Table 1, with details listed in Appendix Table A2 (online only). Fifty-three of these patients (64%) were had IDH1/2 mutations and were compared with 29 consecutive patients with de novo AML without IDH1/2 mutations. IDH1/2 mutations were associated with

Table 1. Characteristics and Outcomes of Patients With AML According to IDH Mutation Status

Characteristic	Total		IDH1 R132		IDH2 R140		IDH2 R172		IDH WT		<i>P</i>
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	
No. of patients	82	100.0	20	24.3	24	29.3	9	11.0	29	35.3	
Age, years											NS
Median	59		56		55		59		63		
Range	22-85		32-74		23-78		26-65		22-85		
Sex											
Male	42		10		10		4		18		
Female	40		10		14		5		11		
WBC, g/L											NS
Median	10.3		4.6		13.4		17.2		11		
Range	0.89-250		0.89-178		1-244		1.2-28.3		1-250		
Circulating blasts, %											NS
Median	40		43.5		30.5		70		39		
Range	0-97		1-91		1-94		6-83		1-97		
BM blasts, %											.04
Median	66		80.5		62		78		60		
Range	11-97		13-95		11-97		55-91		15-93		
FAB											
M0	6	7	1		1		2		2		
M1	27	33	12		4		6		5		
M2	14	17	3		7		1		3		
M4	10	12	0		4		0		6		
M5	19	23	3		8		0		8		
M6	2	2	1		0		0		1		
NC	4	5	0		0		0		4		
IDH mutation											
IDH1 R132C			10	50							
IDH1 R132G			3	15							
IDH1 R132H			7	35							
IDH2 R140L					2	8					
IDH2 R140Q					21	87					
IDH2 R140W					1	4					
IDH2 R172K							9	100			
Gene mutation											
IDH1 rs11554137*	12	15	4	20	2	8	1	11	5	17	
IDH1 V711*	1	1							1	3	
FLT3 (ITD and TKD)	21	26	6	30	10	42	1	11	4	14	NS
NPM1	41	50	12	60	18	75			11	38	< .001
CEBPA	1	1			1	4					
MLL duplication	2	2			2	8					
RUNX1	1	1			1	4					
3-year OS											NS
IDH1		54									
IDH2 R140Q		74									
IDH2 R172K		56									
IDH WT		70									

Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; BM, bone marrow; FAB, French-American-British; NS, not significant; WT, wild type.

*Germ line polymorphisms IDH1 G105G (rs11554137) and IDH1 V711 were previously reported.

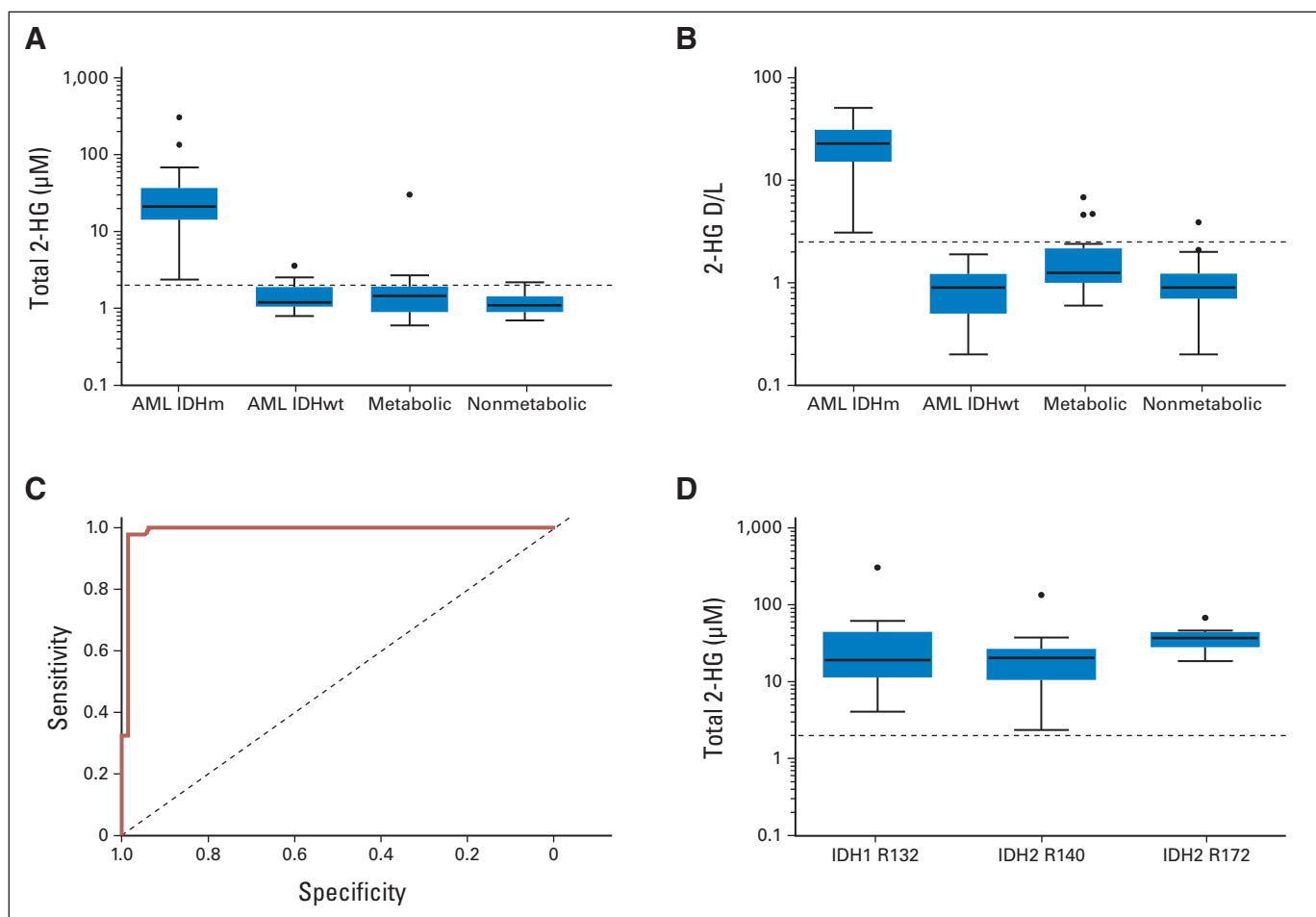


Fig 2. Diagnostic performance of total 2-hydroxyglutarate (2-HG; ie, D plus L stereoisomers) and D to L ratio. Boxplots of (A) total 2-HG and (B) D to L ratio in blood samples at diagnosis from patients with acute myeloid leukemia (AML) with *IDH* mutations (IDHm; *n* = 53) or without (*IDH* wild type [IDHwt]; *n* = 29), as compared with samples from metabolic (*n* = 18) and nonmetabolic reference populations (*n* = 50). Dashed lines indicate proposed screening cutoffs. (C) Area under receiver operator characteristic curve for total 2-HG levels for patients with and without AML at diagnosis (*n* = 150); y-axis, true-positive rate (sensitivity); x-axis, false-positive rate (1-specificity). (D) Boxplot comparing total 2-HG in serum from patients with different *IDH* mutations: *IDH1* R132 (*n* = 20), *IDH2* R140 (*n* = 24), and *IDH2* R172 (*n* = 9).

NPM1 mutations ($P < .001$) but not with *FLT3* mutations (neither ITD nor tyrosine kinase domain [TKD]) and had higher percentage of bone marrow blasts ($P = .04$) compared with *IDH1/2* wild type (Table 1).

2-HG Plasma Level and D to L Stereoisomer Ratio in Patients Without AML

We measured plasma 2-HG levels in a reference population that included 50 consecutive adult patients without metabolic disorders (nonmetabolic reference population) and 18 pediatric or adult patients with known inherited metabolic disease but without mutations in *IDH1/2* or D-2 or L-2 hydroxyglutarate dehydrogenase genes (metabolic reference population; Appendix Table A1, online only). The latter were meant to provide relevant information for metabolic disturbances that may affect 2-HG levels by acting upstream or downstream of the *IDH1/2* enzymes. Because *IDH1/2* mutations produce the D stereoisomer and not the L stereoisomer, we calculated the ratio between D and L to determine which stereoisomer was responsible for increased total 2-HG. Indeed, increased levels of the L stereoisomer may confound the

analysis of total 2-HG, producing false positives. Median total 2-HG (total 2-HG) levels were 1.1 μmol/L (range, 0.7 to 2.2 μmol/L) for the 50 nonmetabolic patients and 1.5 μmol/L (range, 0.6 to 30.4 μmol/L) for the 18 metabolic patients (Fig 2A). Metabolic patients had a higher median D to L ratio (1.3; range, 0.6 to 6.8) than nonmetabolic patients (0.9; range, 0.2 to 3.9; Wilcoxon rank sum test $P = .003$; Fig 2B) but had similar total 2-HG levels (median, 1.4; range, 0.6 to 30.4 μmol/L vs median, 1.1; range, 0.7 to 2.2 μmol/L, respectively; Wilcoxon rank sum test $P = .18$). One patient with a metabolic disorder had a 2-HG level as high as 30 μmol/L but a normal D to L ratio. Overall, these data suggest that some metabolic disturbances may significantly alter 2-HG levels, thereby confounding analysis of patients with AML.

Prediction of *IDH1/2* Mutational Status of Patients With AML at Diagnosis

Patients with AML without *IDH1/2* mutations (*n* = 29) had median total 2-HG levels (1.2; range, 0.8 to 3.6 μmol/L) similar to those of nonmetabolic patients (1.1; range, 0.7 to 2.2 μmol/L) and metabolic patients (1.5; range, 0.6 to 30.4 μmol/L; Wilcoxon rank

sum test $P = .08$, Fig 2A). In contrast, patients with AML with *IDH1/2* mutations had a markedly higher median level (21.2; range, 2.4 to 305.9 $\mu\text{mol/L}$; $P < .001$). Median D to L ratio was 0.9 (range, 0.2 to 1.9) for *IDH1/2* wild-type patients with AML and 22.9 (range, 3.1 to 51.2) for patients with AML with *IDH1/2* mutations (Fig 2B). Total 2-HG level and D to L ratio that ensured maximum specificity at 100% sensitivity to detect *IDH1/2* mutations were approximately 2 $\mu\text{mol/L}$ and 2.5, respectively. At these optimal screening cutoffs, among patients with AML, D to L ratio showed better specificity (100%) than total 2-HG (79%; McNemar test $P = .031$). Thus, only the D to L ratio led to complete separation between patients with AML with or without *IDH1/2* mutations. Nevertheless, this picture may be overoptimistic, because the inclusion of patients without AML reduced specificity of the D to L ratio to 96% (misclassifications included ratios between 3.9 and 6.8 from reference population; Fig 2B).

High values for either total 2-HG or D to L ratio were strongly predictive of the presence of *IDH1/2* mutations. Both had ROC AUCs $> 99\%$, with 95% CI of 98% to 100% (Fig 2C; Appendix Fig A1A, online only). Interestingly, in two patients with AML, *IDH1/2* mutations that had not been detected with the classical Sanger method were revealed by high levels of 2-HG. Deep sequencing identified *IDH1* R132C and *IDH2* R140Q mutations (in patients No. 6 and 37, respectively; Appendix Table A2, online only) at allelic burdens of 10% and 20%, respectively.

Parameters Associated With High 2-HG Level at Diagnosis

We found a strong positive correlation between allelic burden and D to L ratio in patients with *IDH1/2* mutations ($P < .001$; $r^2 = 0.489$; Appendix Figure A2A, online only). D to L ratio also showed positive correlation with WBC counts ($P < .001$; $r^2 = 0.301$; Appendix Fig A2B, online only). Neither *FLT3-ITD* or *-TKD* mutations nor *NPM1* mutations were associated with D to L ratio or total 2-HG ($P = .89$ and $P = .1$, respectively).

Presence of the *IDH2* R172K mutation was associated with increased total 2-HG and D to L ratio compared with *IDH2* R140 and *IDH1* R132 mutations (Kruskal Wallis test $P = .02$ and $P = .04$, respectively; Fig 2D; Appendix Fig A1B, online only). This remained significant after adjustment for WBC counts, percentage of circulating blasts, and percentage of BM blasts (data not shown). Single nucleotide polymorphism rs11554137²⁶ observed in five patients carrying the *IDH1* wild-type coding sequence (patients No. 70, 71, 74, and 78; Appendix Table A2, online only) or polymorphic variant *IDH1* V71I²⁷ (patient No. 54; Appendix Table A2, online only) showed normal levels of 2-HG.

2-HG Level Reflects Clinical Status and Correlates With MRD Markers

The serial collection of total 171 serum samples from 36 patients with *IDH1* or *IDH2* mutations included time points at diagnosis, after induction treatment, during follow-up, and at relapse. Median 2-HG level and D to L ratio in samples at CR were significantly lower (1.3 $\mu\text{mol/L}$ and 1.4, respectively) than those from patients who did not achieve CR after one induction course (6.2 $\mu\text{mol/L}$ and 8.3) as well as from refractory patients (15.8 $\mu\text{mol/L}$ and 23.1) at relapse (5.1 $\mu\text{mol/L}$ and 8.5) and diagnosis (22.4 $\mu\text{mol/L}$ and 21.1; Kruskal Wallis

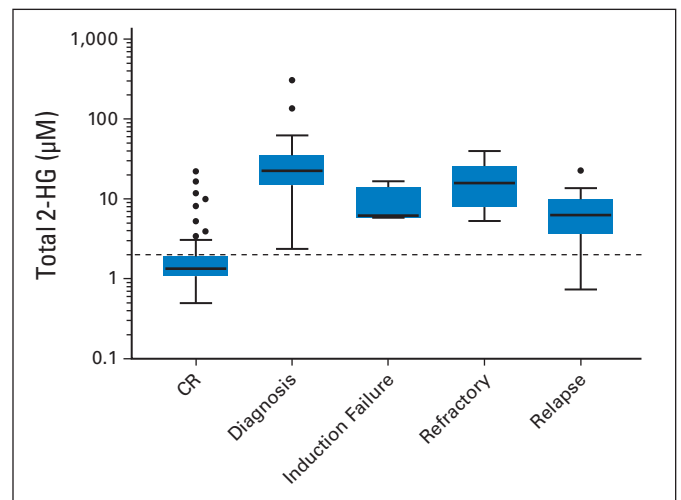


Fig 3. Correlation of total 2-hydroxyglutarate (2-HG; D plus L stereoisomers) level with clinical status. Induction failure indicates no achievement of complete remission (CR) after one induction course.

test $P < .001$ and $P < .001$, respectively; Fig 3; Appendix Fig A3A, online only).

Finally, the relation between 2-HG level and MRD was assessed by comparing 2-HG levels with mutated *NPM1* burden ($n = 17$ patients) or *WT1* expression levels ($n = 19$ patients; Fig 4; Appendix Fig A3B, online only) at diagnosis, at CR, and during follow-up (persistent CR and relapsing patients). A positive correlation was observed between 2-HG level (either total 2-HG or D to L ratio) and *WT1* expression in blood ($n = 48$ paired samples), *WT1* expression in BM ($n = 41$), *NPM1* in blood ($n = 37$), and *NPM1* in bone marrow ($n = 39$; all correlations significant at $P < .001$; $r^2 > 0.3$; Fig 4; Appendix Fig A3B, online only). Thus, both total 2-HG and D to L ratio are good candidate markers of MRD.

Prognostic Impact of Postinduction 2-HG Levels in Patients With *IDH1/2* Mutations

Median follow-up of the 53 patients with *IDH1/2* mutations was 2.9 years (95% CI, 2 months to 6.9 years). Two died during induction treatment, and eight were refractory (five of 20 with *IDH1* R132 and three of nine with *IDH2* R172 mutations). Forty-three of these patients (13 of 20 with *IDH1* R132, 24 of 24 with *IDH2* R140, and six of nine with *IDH2* R172 mutations) achieved CR (81%). After CR achievement, 22 relapsed, and 14 died.

In these 53 patients with *IDH1/2* mutations, univariate prognostic analyses of *IDH1* R132, *IDH2* R140Q, *IDH2* R172K, *FLT3-ITD*, *FLT3-TKD*, and *NPM1* mutations and initial levels of total 2-HG ($>$ or $<$ median level; median, 21.2; range, 2.4 to 305.9 $\mu\text{mol/L}$) revealed that at diagnosis, only the presence of *NPM1* mutation had a significant impact on outcome, because it predicted better overall survival (OS; $P = .005$) although not PFS (log-rank test $P = .1$; Appendix Fig A4, online only). The impact of *NPM1* on OS remained significant after adjustment for age (age as continuous covariable: hazard ratio [HR], 0.26; 95% CI, 0.08 to 0.79; $P = .02$; Appendix Table A3, online only).

Postinduction serum samples were available for 31 of the 43 patients who achieved CR. Median total 2-HG and D to L ratio

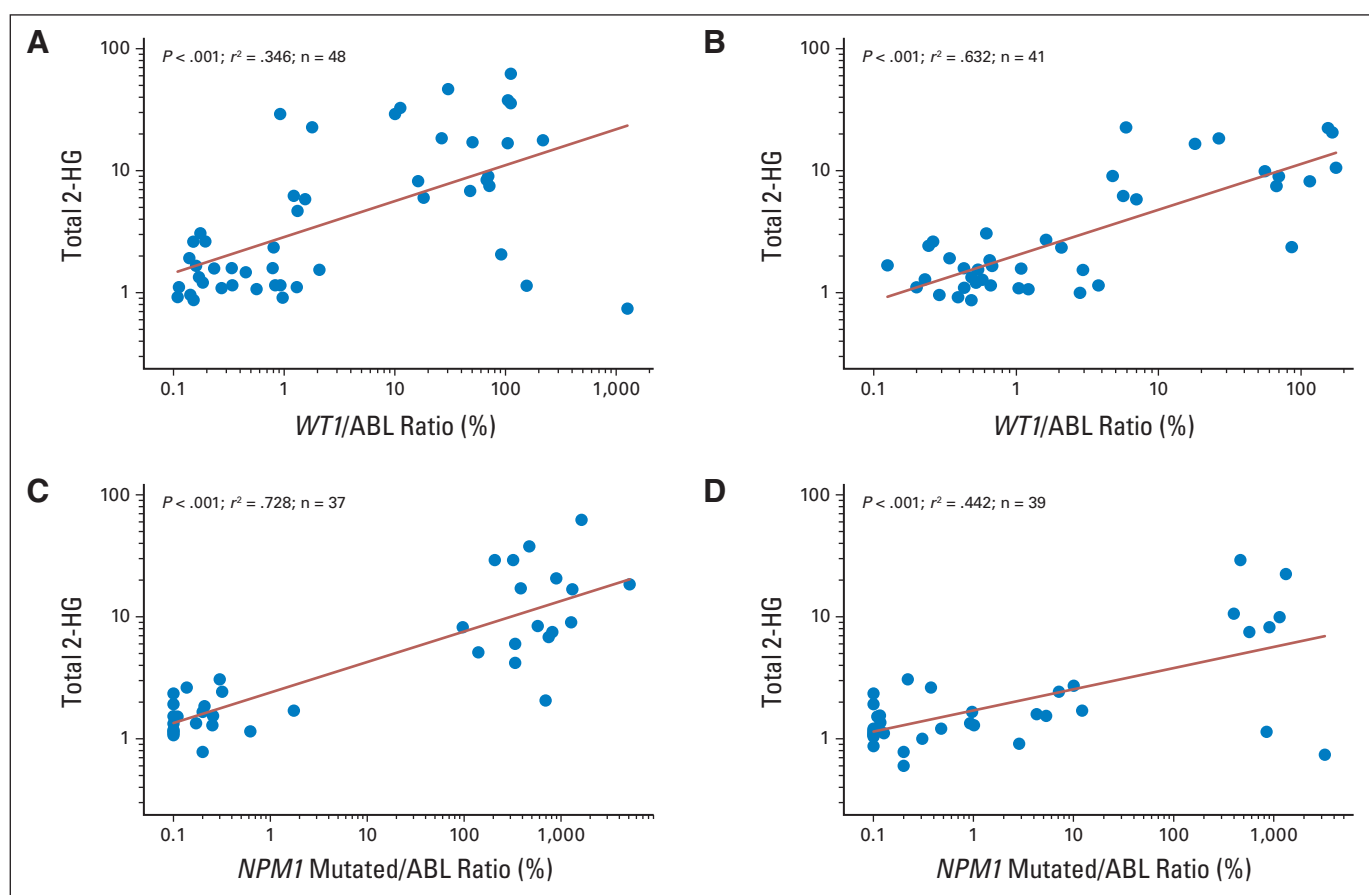


Fig 4. Correlation of total 2-hydroxyglutarate (2-HG; D plus L stereoisomers) level with minimal residual disease markers. Real-time quantitative polymerase chain reaction was used to monitor *WT1* expression level (relative to *ABL1*) in (A) blood and (B) bone marrow (BM) samples and estimate *NPM1* mutation copies (relative to *ABL1* copies) in (C) blood and (D) BM samples. Regression lines, associated *P* values, and *r*² values are indicated.

were 1.7 $\mu\text{mol/L}$ (range, 0.7 to 25.9 $\mu\text{mol/L}$) and 1.88 (range, 0.7 to 23.2), respectively. In these 31 patients with *IDH1/2* mutations in CR, 15 relapsed, and four died (all after relapse). Univariate prognostic analyses of *IDH1* R132, *IDH2* R140Q, *FLT3-ITD*, and *NPM1* mutations and total 2-HG at CR revealed that only 2-HG level at CR had a significant impact on outcome (Table 2). This impact on

PFS remained significant after adjustment for age (age as continuous covariable: HR, 4.37; 95% CI, 1.14 to 16.8; *P* = .032; Table 2). Patients with total 2-HG levels at CR < diagnostic cutoff (ie, < 2 $\mu\text{mol/L}$) had significantly better PFS (*P* = .005) and OS (*P* = .008; Fig 5). The diagnostic cutoff for the D to L ratio (2.5) at CR was not significantly prognostic of PFS (*P* = .17) or OS (*P* = .13).

Table 2. Prognostic Impact of 2-HG Level at CR in Patients With AML With *IDH1/2* Mutations

Variable	PFS			OS*		
	HR	95% CI	<i>P</i>	HR	95% CI	<i>P</i>
Total 2-HG (> 2 ν \leq 2 $\mu\text{mol/L}$)	5.00	1.50 to 16.6	.009	†		.008‡
Total 2-HG (> 2 ν \leq 2 $\mu\text{mol/L}$)§	4.37	1.14 to 16.8	.032			
D to L ratio (> 2.5 ν \leq 2.5)	2.53	0.84 to 7.58	.10	2.12	0.30 to 15.0	.45
<i>NPM1</i>	0.47	0.15 to 1.44	.19	0.25	0.03 to 1.77	.16
<i>FLT3-ITD</i>	1.09	0.36 to 3.32	.89	2.34	0.33 to 16.7	.40
<i>IDH1</i> R132	2.31	0.29 to 18.5	.43	4.73	0.48 to 47.1	.18
<i>IDH2</i> R140Q	0.52	0.16 to 1.67	.27	0.17	0.02 to 1.75	.14

NOTE. Univariate Cox regression analysis of PFS and OS. Bold font indicates significance.

Abbreviations: 2-HG, 2-hydroxyglutarate; AML, acute myeloid leukemia; CR, complete remission; HR, hazard ratio; OS, overall survival; PFS, progression-free survival.

*Not adjusted for age.

†HR impossible to estimate; no event in one of two groups.

‡Log-rank test.

§Age adjusted.

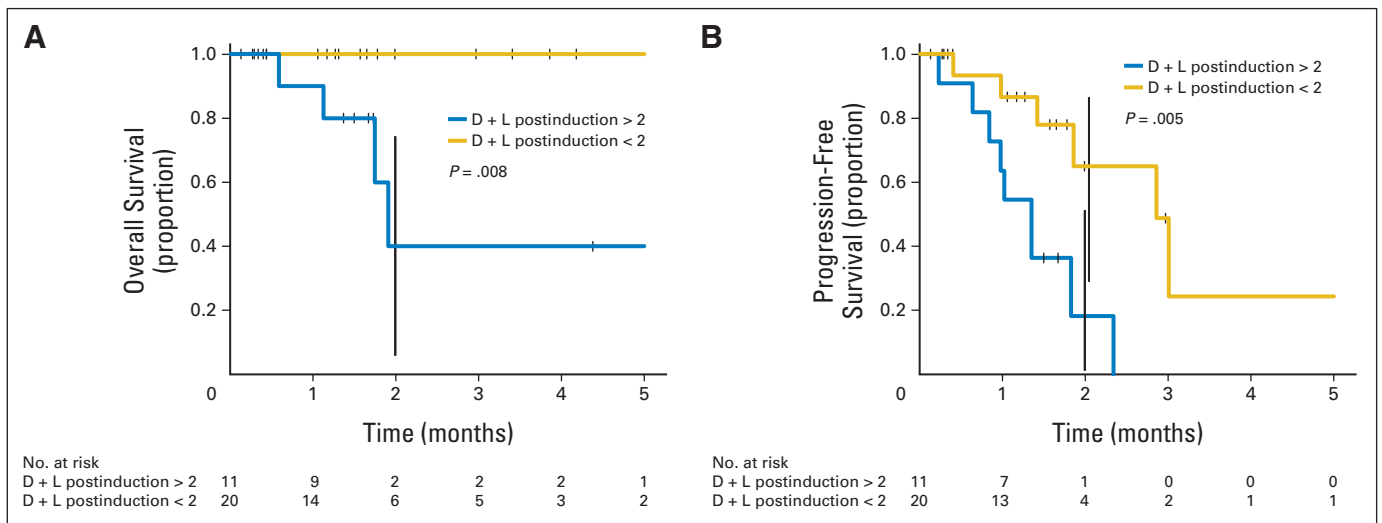


Fig 5. Kaplan-Meier survival curves of (A) overall and (B) progression-free survival for patients with serum levels of total 2-hydroxyglutarate > or < 2 $\mu\text{mol/L}$ (blue v gold lines, respectively) at complete remission.

DISCUSSION

This study suggests that 2-HG released by blast cells in the serum is a biomarker of *IDH1/2* mutations, presumably reflecting the neomorphic enzymatic activity of the mutants. Total 2-HG level correlated with allelic burden and tumor mass. Consistently, 2-HG levels were significantly associated with clinical status (ie, CR v absence of CR) and correlated with available markers of MRD (ie, *NPM1* mutation or *WT1* overexpression). This suggests that serum 2-HG can serve as a marker of MRD. Patients who achieved CR with total 2-HG levels > diagnostic cutoff (ie, 2 $\mu\text{mol/L}$) had decreased PFS and OS.

Because 2-HG levels were elevated in the presence of low mutation burden, the biochemical assay for serum 2-HG may be an efficient, fast, and cost-effective complement to molecular analysis. In addition, serum 2-HG may be of particular interest in follow-up when standard molecular markers are not available (ie, presence of *IDH1/2* mutations but absence of *NPM1* mutations and/or normal *WT1* expression levels). This remains to be confirmed in future prospective studies. 2-HG levels may be informative beyond de novo AML (eg, *IDH1/2* mutations frequently occur in myelodysplastic syndromes and myeloproliferative diseases when they undergo transformation^{28,29}).

As a national reference center for metabolic disorders, we extended the analysis to a reference population of patients with suspected or known metabolic conditions that could affect 2-HG production independent of *IDH1/2* mutations. This provided a framework to better appreciate the strength of the association between 2-HG and different clinical situations. We determined the cutoff of serum total 2-HG level (ie, 2 $\mu\text{mol/L}$) that detected all patients with AML with *IDH1/2* mutations while excluding the greatest fraction of patients and controls with normal *IDH* (thus achieving 89% specificity at 100% sensitivity). In addition, we reasoned that because only the D form is produced by *IDH1/2*-mutant enzymes,^{1,27,30} specificity could further increase if we were to measure the level of the *IDH*-specific D form or ratio between D and the alternative L form rather than total 2-HG. Indeed, when we considered the entire sample of

patients with AML and controls without AML, the D to L ratio (with cutoff at 2.5) provided better specificity than total 2-HG to predict *IDH1/2* mutations (96% v 89% at 100% sensitivity). D to L ratio actually led to complete separation between the two groups of patients with AML (*IDH1/2* mutations v *IDH1/2* wild type). The diagnostic performance of serum D stereoisomer alone was identical to that of the D to L ratio (data not shown). However, the D to L ratio has the additional advantage of being technically more reliable than measuring 2-HG concentrations (whether total or D stereoisomer), because its quantification does not require the addition of an internal standard. Therefore, we focused on the D to L ratio rather than the D stereoisomer as a complementary method to the more standard assay for total 2-HG.

Presence of *IDH1/2* mutations is relevant for prognosis and treatment of a subset of patients with AML.¹³ Recent results further indicate that a small-molecule selectively inhibits 2-HG production by *IDH1* R132 mutation.³¹ Therefore, we argue that total 2-HG can serve as a surrogate marker of treatment efficacy. In addition, our finding that total 2-HG level at CR was significantly predictive of outcome could be of particular interest for patients with a so-called favorable genotype (ie, *NPM1* mutations associated with *IDH1* or *IDH2* in absence of *FLT3-ITD*).¹³ In these patients, elevated levels of total 2-HG after induction therapy could modify therapeutic options, notably making a stronger case for allogeneic stem-cell transplantation.

Finally, our data raise the possibility that additional metabolic markers could be useful in follow-up studies. Indeed, outcome was significantly predicted by total 2-HG, but not or only weakly by D to L ratio. We infer that other putative sources of metabolic dysfunction that involve the L form of 2-HG might affect outcome.

AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Although all authors completed the disclosure declaration, the following author(s) and/or an author's immediate family member(s) indicated a financial or other interest that is relevant to the subject matter under

consideration in this article. Certain relationships marked with a “U” are those for which no compensation was received; those relationships marked with a “C” were compensated. For a detailed description of the disclosure categories, or for more information about ASCO’s conflict of interest policy, please refer to the Author Disclosure Declaration and the Disclosures of Potential Conflicts of Interest section in Information for Contributors.

Employment or Leadership Position: None **Consultant or Advisory**

Role: Stéphane de Botton, Agios Pharmaceuticals (C) **Stock Ownership:**

None **Honoraria:** None **Research Funding:** None **Expert Testimony:**

None **Patents:** None **Other Remuneration:** None

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and design: Maxime Janin, Elena Mylonas, Véronique Saada, Jean-Baptiste Micol, Olivier Adrien Bernard, Virginie Penard-Lacronique, Chris Ottolenghi, Stéphane de Botton

Provision of study materials or patients: Hervé Dombret

Collection and assembly of data: Maxime Janin, Elena Mylonas, Véronique Saada, Jean-Baptiste Micol, Aline Renneville, Cyril Quivoron, Laurianne Scourzic, Sébastien Forget, Cécile Pautas, Denis Caillot, Claude Preudhomme, Hervé Dombret, Céline Berthon, Robert Barouki, Daniel Rabier, Nathalie Auger, Frank Griscelli, Elisabeth Chachaty, Edwige Leclercq, Marie-Hélène Courtier, Annelise Bennaceur-Griscelli, Virginie Penard-Lacronique, Chris Ottolenghi, Stéphane de Botton

Data analysis and interpretation: Maxime Janin, Elena Mylonas, Véronique Saada, Jean-Baptiste Micol, Aline Renneville, Cyril Quivoron, Serge Koscielny, Laurianne Scourzic, Claude Preudhomme, Hervé Dombret, Robert Barouki, Daniel Rabier, Nathalie Auger, Annelise Bennaceur-Griscelli, Eric Solary, Olivier Adrien Bernard, Virginie Penard-Lacronique, Chris Ottolenghi, Stéphane de Botton

Manuscript writing: All authors

Final approval of manuscript: All authors

REFERENCES

- Dang L, White DW, Gross S, et al: Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 462:739-744, 2009
- Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, et al: Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* 18:553-567, 2010
- Chowdhury R, Yeoh KK, Tian YM, et al: The oncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases. *EMBO Rep* 12:463-469, 2011
- Lu C, Ward PS, Kapoor GS, et al: IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature* 483:474-478, 2012
- Sasaki M, Knobbe CB, Munger JC, et al: IDH1(R132H) mutation increases murine haematopoietic progenitors and alters epigenetics. *Nature* 488:656-659, 2012
- Akalin A, Garrett-Bakelman FE, Kormaksson M, et al: Base-pair resolution DNA methylation sequencing reveals profoundly divergent epigenetic landscapes in acute myeloid leukemia. *PLoS Genet* 8:e1002781, 2012
- Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, et al: Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med* 361:1058-1066, 2009
- Marcucci G, Maharry K, Wu YZ, et al: IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: A Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 28:2348-2355, 2010
- Patel KP, Ravandi F, Ma D, et al: Acute myeloid leukemia with IDH1 or IDH2 mutation: Frequency and clinicopathologic features. *Am J Clin Pathol* 135:35-45, 2011
- Welch JS, Ley TJ, Link DC, et al: The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell* 150:264-278, 2012
- Boissel N, Nibourel O, Renneville A, et al: Prognostic impact of isocitrate dehydrogenase enzyme isoforms 1 and 2 mutations in acute myeloid leukemia: A study by the Acute Leukemia French Association group. *J Clin Oncol* 28:3717-3723, 2010
- Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, et al: IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. *J Clin Oncol* 28:3636-3643, 2010
- Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, et al: Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 366:1079-1089, 2012
- Gross S, Cairns RA, Minden MD, et al: Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. *J Exp Med* 207:339-344, 2010
- Sellner L, Capper D, Meyer J, et al: Increased levels of 2-hydroxyglutarate in AML patients with IDH1-R132H and IDH2-R140Q mutations. *Eur J Haematol* 85:457-459, 2010
- Ward PS, Patel J, Wise DR, et al: The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate: Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: Alterations at a crossroads of cellular metabolism. *Cancer Cell* 17:225-234, 2010
- Capper D, Simon M, Langhans CD, et al: 2-Hydroxyglutarate concentration in serum from patients with gliomas does not correlate with IDH1/2 mutation status or tumor size. *Int J Cancer* 131:766-768, 2012
- Fathi AT, Sadzadeh H, Borger DR, et al: Prospective serial evaluation of 2-hydroxyglutarate, during treatment of newly diagnosed acute myeloid leukemia, to assess disease activity and therapeutic response. *Blood* 120:4649-4652, 2012
- Balss J, Pusch S, Beck AC, et al: Enzymatic assay for quantitative analysis of (D)-2-hydroxyglutarate. *Acta Neuropathol* 124:883-891, 2012
- Castaigne S, Pautas C, Terré C, et al: Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-0701): A randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* 379:1508-1516, 2012
- Thomas X, Raffoux E, Botton Sd, et al: Effect of priming with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in younger adults with newly diagnosed acute myeloid leukemia: A trial by the Acute Leukemia French Association (ALFA) Group. *Leukemia* 21:453-461, 2007
- Pautas C, Merabet F, Thomas X, et al: Randomized study of intensified anthracycline doses for induction and recombinant interleukin-2 for maintenance in patients with acute myeloid leukemia age 50 to 70 years: Results of the ALFA-9801 study. *J Clin Oncol* 28:808-814, 2010
- Gorello P, Cazzaniga G, Alberti F, et al: Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. *Leukemia* 20:1103-1108, 2006
- Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, et al: Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: A European LeukemiaNet study. *J Clin Oncol* 27:5195-5201, 2009
- Duran M, Kamerling JP, Bakker HD, et al: L-2-hydroxyglutaric aciduria: An inborn error of metabolism? *J Inher Metab Dis* 3:109-112, 1980
- Wagner K, Damm F, Göhring G, et al: Impact of IDH1 R132 mutations and an IDH1 single nucleotide polymorphism in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: SNP rs11554137 is an adverse prognostic factor. *J Clin Oncol* 28:2356-2364, 2010
- Ward PS, Cross JR, Lu C, et al: Identification of additional IDH mutations associated with oncometabolite R(-)-2-hydroxyglutarate production. *Oncogene* 31:2491-2498, 2012
- Tefferi A, Lasho TL, Abdel-Wahab O, et al: IDH1 and IDH2 mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis. *Leukemia* 24:1302-1309, 2010
- Hussein K, Engelhardt BM, Kreipe H, et al: IDH mutation analysis is not suitable for the routine molecular diagnostic algorithm in myeloproliferative and myelodysplastic neoplasms. *Blood* 116:5073-5074, 2010
- Wang P, Dong Q, Zhang C, et al: Mutations in isocitrate dehydrogenase 1 and 2 occur frequently in intrahepatic cholangiocarcinomas and share hypermethylation targets with glioblastomas. *Oncogene* 32:3091-3100, 2012
- Losman JA, Looper R, Koivunen P, et al: (R)-2-hydroxyglutarate is sufficient to promote leukemogenesis and its effects are reversible. *Science* 339:1621-1625, 2013

Affiliations

Maxime Janin, Robert Barouki, Daniel Rabier, and Chris Ottolenghi, Biochimie Métabolique, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupe Hospitalier Necker-Enfants Malades; Maxime Janin, Robert Barouki, and Chris Ottolenghi, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U747, Université Paris Descartes; Hervé Dombret, Hôpital Saint-Louis, Paris; Elena Mylonas, Cyril Quivoron, Laurianne Scourzic, Olivier Adrien Bernard, Virginie Penard-Lacronique, and Stéphane de Botton, INSERM U985, Institut Gustave Roussy; Elena Mylonas, Cyril Quivoron, Laurianne Scourzic, Eric Solary, Olivier Adrien Bernard, and Virginie Penard-Lacronique, Institut Fédératif de Recherche 54, Institut Gustave Roussy; Véronique Saada, Sébastien Forget, Nathalie Auger, Frank Griscelli, Elisabeth Chachaty, Edwige Leclercq, Marie-Hélène Courtier, and Annelise Bennaceur-Griscelli, Institut Gustave Roussy; Jean-Baptiste Micol and Stéphane de Botton, Hématologie Clinique, Institut Gustave Roussy; Serge Koscielny, Service de Biostatistique et d'Epidémiologie, Institut Gustave Roussy, Villejuif; Elena Mylonas, Cyril Quivoron, Laurianne Scourzic, Olivier Adrien Bernard, Virginie Penard-Lacronique, Chris Ottolenghi, and Stéphane de Botton, Université Paris Sud-11, Orsay; Aline Renneville and Claude Preudhomme, Hématologie Biologique, Centre Hospitalier Régional Universitaire (CHRU) Lille; Céline Berthon, Hématologie Clinique, CHRU Lille, Lille; Cécile Pautas, Hématologie Clinique, Centre Hospitalier Henri Mondor, Créteil; and Denis Caillot, Hématologie Clinique, Centre Hospitalier Universitaire Dijon, Dijon, France.

Help Your Patients Understand Advanced Cancer Care Planning

ASCO's *Advanced Cancer Care Planning* booklet is designed to help people with advanced cancer and their families and caregivers understand the diagnosis and treatment options for advanced cancer, discuss these options for care throughout the course of the illness, and find support.

Order English or Spanish copies of these booklets at www.cancer.net/estore. Free shipping is included and ASCO members receive a 20% discount.



American Society of Clinical Oncology

Acknowledgment

We thank Marion LeGentil (Institut Gustave Roussy, Villejuif, France) for technical support on Ion Torrent sequencing and Daniel Ricquier, PhD, and Alex Duval, MD, PhD, for invaluable support.

Appendix**Table A1.** Baseline Characteristics of Patients Without AML

Patient No.	Sex	Age (years)	FAB	WBC (g/L)	Circulating Blasts (%)	BM Blasts (%)	Caryotype	IDH1 rs11554137	IDH1	IDH2	FLT3	NPM1	Other Mutation
1	F	63	M2	4.4	38	43	CN	Het	R132C		FLT3-ITD		
2	F	69	M1	1	11	69	CN		R132C				
3	M	60	M2	6.2	84	51	CN		R132C				
4	M	39	M6	0.89	20	13	CN		R132C				
5	M	74	M1	2.4	49	79	Trisomy 8		R132C				
6	M	34	M0	2.9	2	50	Trisomy 8	Het	R132C				
7	M	64	M1	2.4	20	85	CN	Het	R132C				
8	F	67	M1	1.4	1	85	CN		R132C			NPM1	
9	F	60	M1	10.01	96	93	CN	Het	R132C			NPM1	
10	F	53	M1	2	15	86	CN		R132C		FLT3-ITD	NPM1	
11	M	68	M1	1.6	26	72	CN		R132G		FLT3-TKD	NPM1	
12	F	67	M1	4.8	70	75	CN		R132G			NPM1	
13	M	48	M1	1.9	22	90	CN		R132G			NPM1	
14	F	71	M1	162	89	93	CN		R132H		FLT3-ITD		
15	F	47	M1	76.9	90	90	CN		R132H		FLT3-ITD	NPM1	
16	M	40	M5	178.6	90	95	CN		R132H		FLT3-ITD	NPM1	
17	F	49	M2	7.86	57	60	CN		R132H			NPM1	
18	M	53	M1	55.8	91	88	CN		R132H			NPM1	
19	M	32	M5	10.78	2	20	CN		R132H			NPM1	
20	F	46	M5	88.1	86	82	CN		R132H			NPM1	
21	M	53	M2	6.8	4	47	CN			R140L	FLT3-TKD	NPM1	
22	F	61	M4	11.8	30	60	CN			R140L		NPM1	
23	F	78	M5	15	70	67	CN			R140Q	FLT3-ITD		
24	M	68	M2	1	4	57	CN			R140Q			
25	M	75	M0	1.9	1	44	CN			R140Q			RUNX1
26	M	65	M5	17.6	3	22	CN			R140Q			MLL duplication
27	F	39	M1	118.9	94	86	CN			R140Q			CEBPA
28	F	54	M2	11.6	42	48	CN			R140Q			MLL duplication
29	F	23	M5	141	97	79	CN			R140Q	FLT3-ITD	NPM1	
30	M	53	M5	30.8	31	82	CN			R140Q	FLT3-TKD	NPM1	
31	M	59	M1	4	7	86	CN			R140Q	FLT3-TKD	NPM1	
32	F	40	M4	3.7	0	35	CN			R140Q		NPM1	
33	F	56	M5	30.1	9	52	CN			R140Q		NPM1	
34	F	70	M4	8.8	11	11	CN			R140Q		NPM1	
35	F	61	M2	2.8	2	45	CN			R140Q		NPM1	
36	M	55	M4	34.3	1	65	CN			R140Q		NPM1	
37	M	55	M2	2.3	5	52	CN			R140Q		NPM1	
38	F	63	M2	96	70	80	CN			R140Q	FLT3-ITD	NPM1	
39	F	57	M1	244	91	97	CN			R140Q	FLT3-ITD	NPM1	
40	M	47	M5	4.3	80	75	CN			R140Q	FLT3-ITD	NPM1	
41	F	41	M1	16.3	75	89	CN	Het		R140Q	FLT3-ITD	NPM1	
42	F	52	M5	1.3	68	64	CN	Het		R140Q		NPM1	
43	F	42	M5	25	60	20	CN			R140Q		NPM1	
44	M	42	M2	46.5	73	64	CN			R140W	FLT3-TKD	NPM1	
45	F	65	M1	18.6	82	89	CN			R172K	FLT3-TKD		
46	F	59	M1	28.3	50	61	CN			R172K			
47	F	59	M1	1.6	6	78	CN			R172K			
48	F	44	M1	34.2	83	91	CN			R172K			

(continued on following page)

Serum 2-HG Is a Biomarker of *IDH*-Mutated AML

Table A1. Baseline Characteristics of Patients Without AML (continued)

Patient No.	Sex	Age (years)	FAB	WBC (g/L)	Circulating Blasts (%)	BM Blasts (%)	Caryotype	<i>IDH1</i> rs11554137	<i>IDH1</i>	<i>IDH2</i>	<i>FLT3</i>	<i>NPM1</i>	Other Mutation
49	M	53	M1	17.2	70	75	Trisomy 10			R172K			
50	M	49	M1	1.2	2	60	CN			R172K			
51	M	26	M0	4.9	80	87	CN			R172K			
52	M	65	M0	27.3	84	83	CN			R172K			
53	F	62	M2	1.8	26	55	CN	Het		R172K			
54	M	72	NC	44	1	19	CN	Hom	V71I				
55	M	63	NC	11	20	86	CN				<i>FLT3-TKD</i>		
56	F	70	M1	1.2	1	74	Trisomy 8						
57	F	42	M4	44.7	59	39	CN						
58	F	46	M2	6.7	4	40	CN						
59	F	66	M5	76	68	60	CN						
60	F	55	M0	2.262	58	87	CN						
61	M	22	M5	134.9	95	84	CN						
62	M	37	M4	250	81	60	CN						
63	M	60	M1	2.9	4	16	CN						
64	M	61	M6	1.2	10	44	CN						
65	M	58	M5	3.9	15	62	Tetrasomy 8						
66	M	63	M1	1.6	3	37	CN						
67	M	73	M2	1.4	4	15	Y loss						
68	M	73	NC	3.7	9	20	Trisomy 8						
69	M	69	M0	44.4	94	92	CN						
70	F	57	M4	10.6	39	39	CN	Het					
71	M	77	NC	1.7	0	26	CN	Het					
72	F	70	M5	71	32	20	ND					<i>NPM1</i>	
73	M	78	M1	19.4	74	88	Monosomy 8					<i>NPM1</i>	
74	M	85	M4	5.6	26	82	CN	Het				<i>NPM1</i>	
75	M	48	M2	1.1	4	38	CN					<i>NPM1</i>	
76	M	52	M4	80.9	63	74	CN				<i>FLT3-ITD</i>	<i>NPM1</i>	
77	M	43	M5	1.9	57	61	CN				<i>FLT3-ITD</i>	<i>NPM1</i>	
78	F	63	M5	181.9	87	85	CN	Het			<i>FLT3-ITD</i>	<i>NPM1</i>	
79	F	46	M5	63.6	75	54	CN					<i>NPM1</i>	
80	F	69	M5	14.2	86	84	CN					<i>NPM1</i>	
81	F	51	M4	66	79	76	CN					<i>NPM1</i>	
82	M	71	M1	138	97	93	CN					<i>NPM1</i>	

Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; BM, bone marrow; CN, cytogenetically normal; FAB, French-American-British; het, heterozygous; hom, homozygous; NC, not classified; ND, not determined.

Table A2. Detailed Clinical Characteristics of Patients Without AML

Characteristic	Metabolic Population (No.)	Nonmetabolic Population (No.)
Total No. of patients	18	50
Age, years		
Median	17	41
Range	0.5-56	19-73
Sex		
Male	8	28
Female	10	22
Organic acidurias*	8	
Aminoacidopathies†	5	
Energy metabolism deficiencies‡	5	
Unexplained neurologic disorders§		34
Various disorders		16

Abbreviation: AML, acute myeloid leukemia.

*Including succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency, glutaric aciduria type 1, propionic and isovaleric aciduria, and alkaptonuria.

†Including ornithine transcarbamoylase deficiency, arginase deficiency, lysinuric protein intolerance, cystathione beta-synthetase deficiency, and phenylketonuria.

‡Including pyruvate dehydrogenase deficiency and respiratory chain complex IV and I deficiency.

§Including cognitive impairment, pyramidal and/or extrapyramidal symptoms, epilepsy, and hypotonia.

||Including lethargy, vomiting, malnutrition, hypoglycemia, metabolic acidosis, ketoacidosis, hyperammonemia, microcephaly, and disorders of neural development.

Table A3. Prognostic Impact of 2-HG at Diagnosis in Patients With AML With *IDH1/2* Mutations

Variable	PFS			OS		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
D plus L > median	0.78	0.34 to 1.80	.56	1.04	0.32 to 3.34	.95
D to L ratio > median	0.62	0.27 to 1.44	.26	1.01	0.31 to 3.24	.99
<i>NPM1</i>	0.56	0.25 to 1.23	.15	0.26	0.08 to 0.79	.02
<i>FLT3-ITD</i>	1.09	0.45 to 2.62	.85	1.94	0.51 to 7.36	.33
<i>FLT3-TKD</i>	0.45	0.10 to 1.93	.28	0.93	0.20 to 4.24	.92
<i>IDH1</i> R132	0.53	0.25 to 1.15	.11	0.51	0.19 to 1.37	.18
<i>IDH2</i> R140Q	0.81	0.38 to 1.72	.58	1.85	0.59 to 5.75	.29
<i>IDH2</i> R172K	1.44	0.50 to 4.19	.50	0.63	0.20 to 1.96	.20

NOTE. Univariate Cox regression analysis for PFS and OS. Continuous adjustment for age. Bold font indicates significance.

Abbreviations: 2-HG, 2-hydroxyglutarate; AML, acute myeloid leukemia; HR, hazard ratio; OS, overall survival; PFS, progression-free survival.

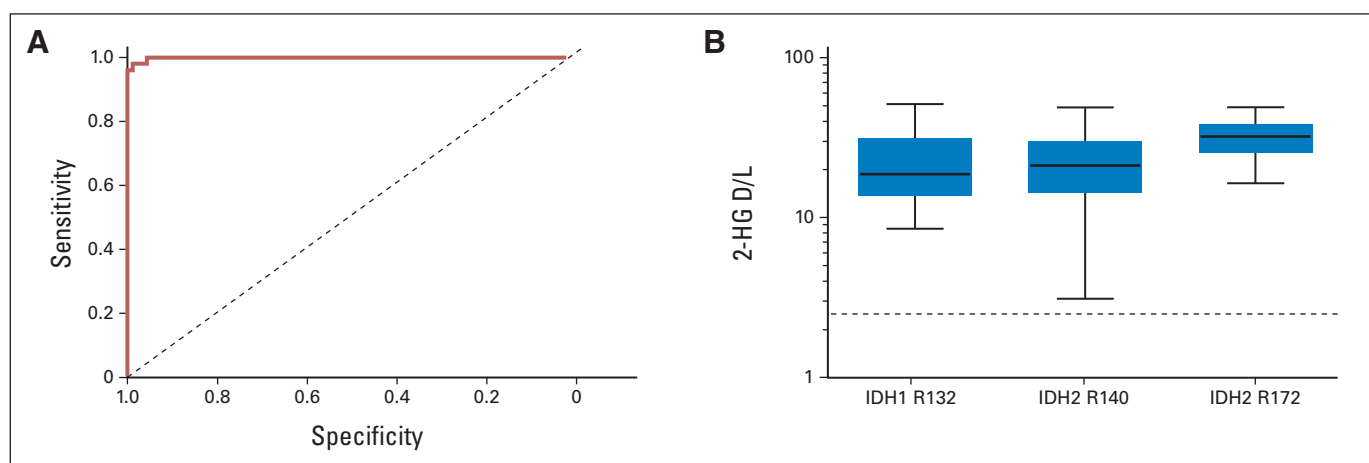


Fig A1. (A) Areas under receiver operator characteristic curve for 2-hydroxyglutarate (2-HG) and D to L ratio for patients with and without acute myeloid leukemia (AML) at diagnosis (n = 150). (B) Comparison of D to L ratio in serum from patients with AML at diagnosis with different mutation sites: *IDH1* R132 (n = 20), *IDH2* R140 (n = 24), and *IDH2* R172 (n = 9).

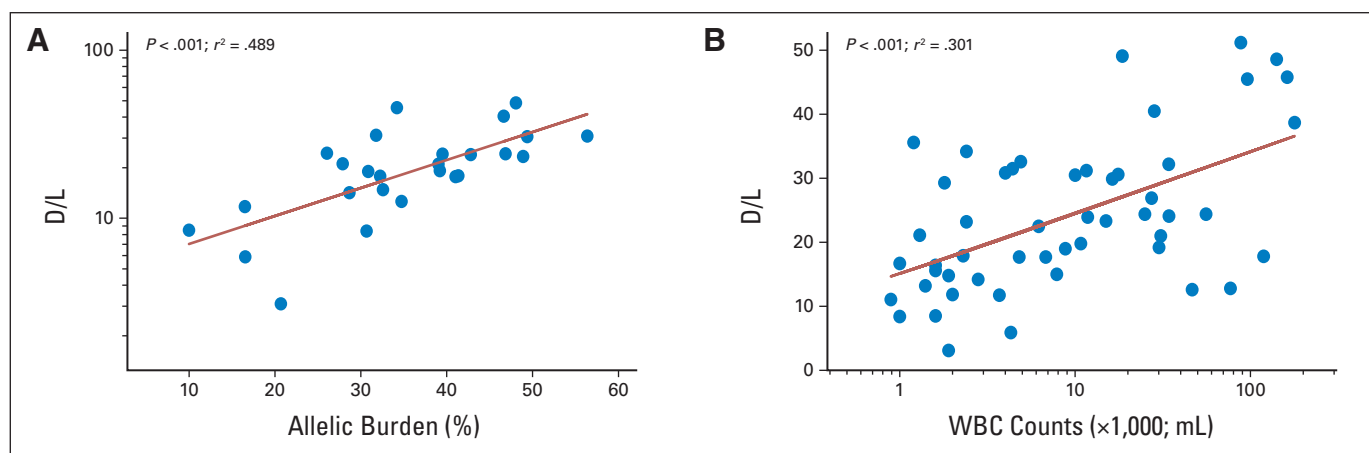


Fig A2. Correlation of D to L ratio with (A) mutation burden and (B) WBC count. Regression lines, associated *P* values, and *r*² values are indicated.

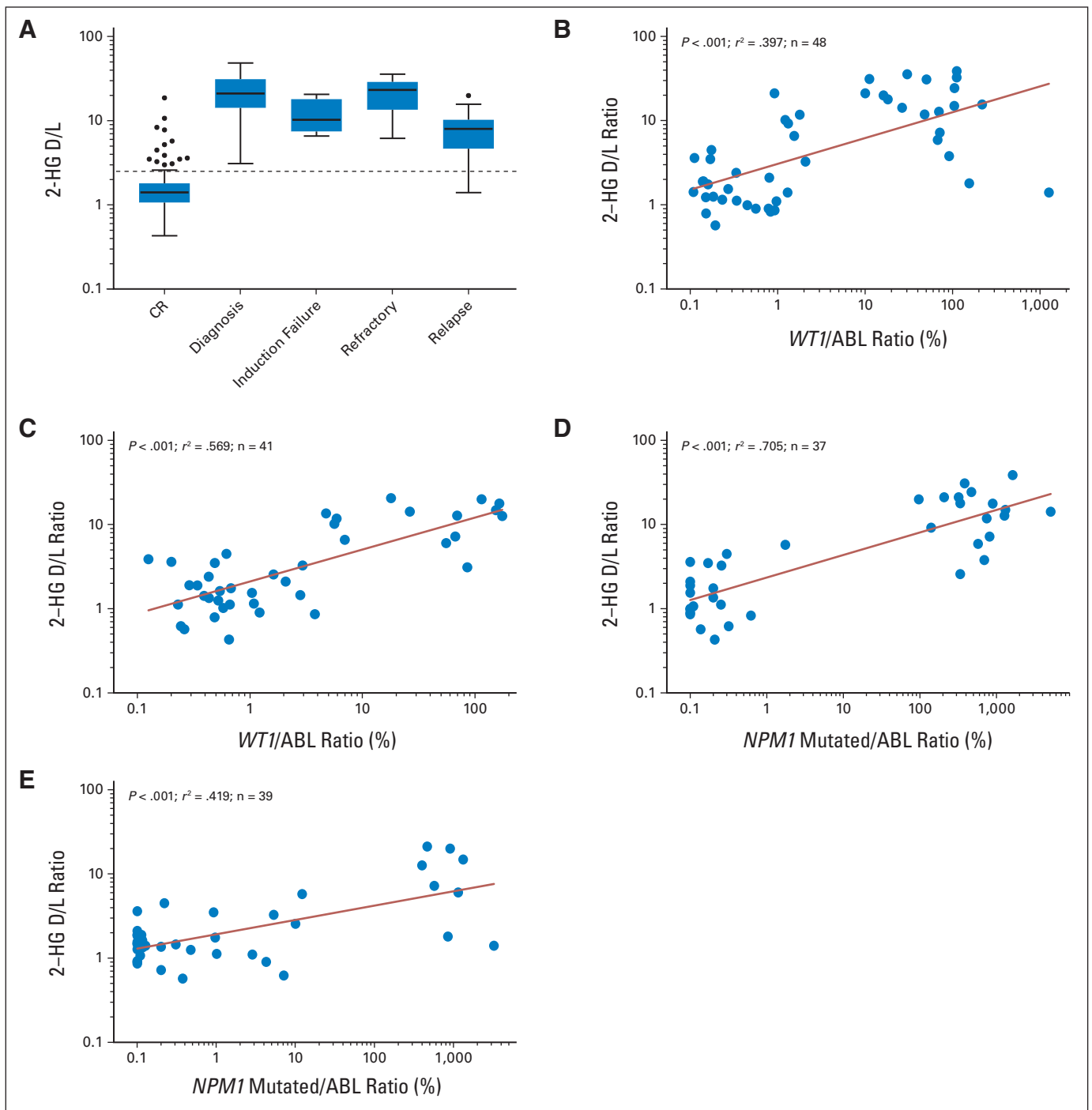


Fig A3. Correlation of D to L level with (A) clinical status and (B) minimal residual disease markers. Real-time quantitative polymerase chain reaction was used to estimate *NPM1* mutation copies (relative to *ABL1* copies) and monitor *WT1* expression level (relative to *ABL1* expression level) in blood and bone marrow (BM) samples. Regression lines, associated *P* values, and r^2 values are indicated. Induction failure indicates no achievement of complete remission (CR) after one induction course. (A) Clinical status. *WT1* expression in (B) blood or (C) BM. *NPM1* copy numbers in (D) blood and (E) BM.

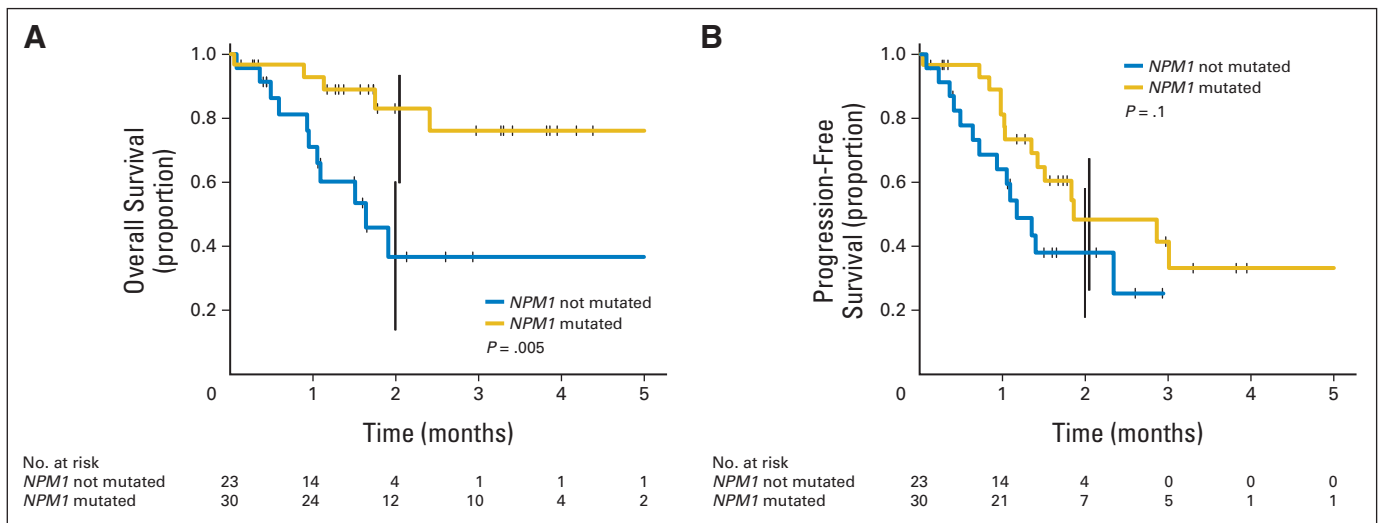


Fig A4. Kaplan-Meier survival curves for 53 patients with acute myeloid leukemia with *IDH* mutations with ($n = 30$) or without ($n = 23$) *NPM1* mutations (gold v blue lines, respectively). (A) Overall survival; (B) progression-free survival.

REFERENCES

- 1 Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992; **148**: 2207–2216.
- 2 Green DR. *Means to an End: Apoptosis and other Cell Death Mechanisms*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, NY, USA, 2011.
- 3 Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV *et al*. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 2012; **19**: 107–120.
- 4 Suzuki J, Denning DP, Imanishi E, Horvitz HR, Nagata S. Xk-related protein 8 and CED-8 promote phosphatidylserine exposure in apoptotic cells. *Science* 2013; **341**: 403–406.
- 5 Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994; **84**: 1415–1420.
- 6 Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM *et al*. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by over-expression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995; **182**: 1545–1556.
- 7 Demchenko AP. Beyond annexin V: fluorescence response of cellular membranes to apoptosis. *Cytotechnology* 2013; **65**: 157–172.
- 8 Suzuki J, Umeda M, Sims PJ, Nagata S. Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature* 2010; **468**: 834–838.
- 9 Boersma AW, Nooter K, Oostrum RG, Stoter G. Quantification of apoptotic cells with fluorescein isothiocyanate-labeled annexin V in chinese hamster ovary cell cultures treated with cisplatin. *Cytometry* 1996; **24**: 123–130.
- 10 McStay GP, Salvesen GS, Green DR. Overlapping cleavage motif selectivity of caspases: implications for analysis of apoptotic pathways. *Cell Death Differ* 2008; **15**: 322–331.
- 11 Smolewski P, Bedner E, Du L, Hsieh TC, Wu JM, Phelps DJ *et al*. Detection of caspases activation by fluorochrome-labeled inhibitors: multiparameter analysis by laser scanning cytometry. *Cytometry* 2001; **44**: 73–82.
- 12 Nagata S. DNA degradation in development and programmed cell death. *Annu Rev Immunol* 2005; **23**: 853–875.
- 13 Oltsdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA *et al*. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 2005; **435**: 677–681.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Isocitrate dehydrogenase (IDH)2 R140Q mutation induces myeloid and lymphoid neoplasms in mice

Leukemia (2014) **28**, 1343–1346; doi:10.1038/leu.2014.18

Monoallelic point mutations in isocitrate dehydrogenase (IDH) define distinct subsets of lower-grade glioma and secondary glioblastoma, chondrosarcoma, intrahepatic cholangiocarcinomas and hematological malignancies. IDH is a metabolic enzyme that interconverts isocitrate and α -ketoglutarate (α KG), but cancer-associated point mutations in IDH confer a new or neomorphic activity that allows reduction of α KG to the oncometabolite R-2-hydroxyglutarate (2-HG).¹ As a consequence, IDH-mutated cancers display increased intracellular 2-HG concentrations of 10- to 100-fold. In patients suffering from acute myeloid leukemias (AML), 2-HG level in serum is a predictor of the presence of IDH mutations and patient outcome.^{2–4} Although the precise oncogenic consequences of IDH mutations remain unclear, high levels of 2-HG have been shown to inhibit α KG-dependent dioxygenases, including the EglN prolyl-4-hydroxylases that regulate the activity of the hypoxia-responsive HIF transcription factor as well as the JmjC domain-containing histone demethylases and TET methylcytosine hydroxylases that have critical roles in epigenetic gene regulation (reviewed in Losman *et al.*⁵). Mutations of IDH and TET2 are mutually exclusive in AML suggesting that they may act along the same pathway.⁶ In human cancers, IDH mutants expression associates with hypermethylation of CpG loci and *in vitro* and *in vivo* modeling of IDH mutations results in histone H3 and H4 methylation modifications and DNA hypermethylation as well as block in cellular differentiation⁷ (and reviewed in Losman *et al.*⁵). Specific pharmacological inhibition of IDH mutants results in decrease of 2-HG levels and release of the differentiation block.^{8–10}

In human hematological malignancies, IDH mutations are more frequent in acute than in chronic diseases. Consistent with this, IDH1^{R132H} or IDH2^{R140Q} are frequent in AML and mice engineered to express these mutations in hematopoietic cells show defects in stem/early progenitor cells differentiation.^{11,12} However, except following oncogenic collaboration with high levels of HOXA9¹³ or

with *Flt3-ITD* or *Nras*^{G12D},¹² none of these mutants triggers full-blown leukemia in mouse models. Moreover, none gives rise to lymphoid malignancies, whereas IDH2 mutations are frequent in human angioimmunoblastic T-cell lymphoma.¹⁴ To analyze IDH2^{R140Q} oncogenic activity in myeloid and lymphoid lineages, we assayed its retrovirally mediated expression in murine primary hematopoietic bone marrow (BM) stem/progenitor populations using a Murine Stem Cell Virus (MSCV)-IRES-eGFP vector expressing the mutant. It was previously reported that ectopic expression of IDH2^{R140Q} in primary murine hematopoietic BM cells in culture leads to an increase in the proportion of stem/progenitor cells defined as lineage- (lin-), sca-1 + c-kit + (LSK)⁶ and that its expression in the human erythroleukemia TF-1 cell line

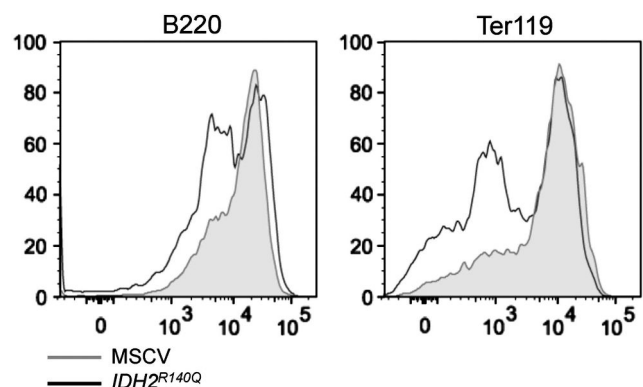


Figure 1. The retroviral-mediated expression of IDH2^{R140Q} reduces differentiation of primary murine bone marrow lineage-sca-1 + c-kit + (LSK) cells toward myeloid and lymphoid lineages in culture. Representative histograms analyzing the erythroid (Ter119)- and B lymphoid (B220)-positive compartments from MSCV- and MSCV-IDH2^{R140Q}-transduced LSK cells upon 17 days of coculture with MS5 stromal cells. Live cells were gated using forward and side scatter and further gated on GFP-positivity. GFP, green fluorescent protein; MSCV, murine stem cell virus.

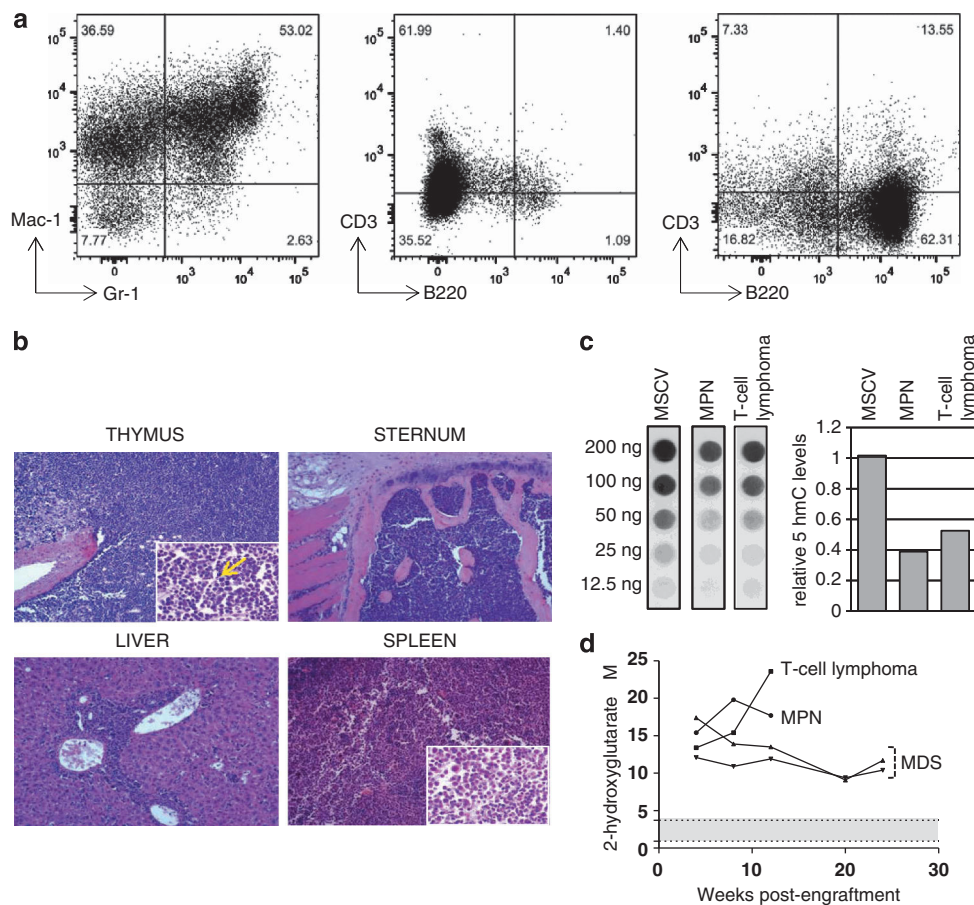


Figure 2. *IDH2*^{R140Q} promotes the development of hematological proliferations of myeloid or lymphoid origins in mice. **(a)** Representative FACS profiles of bone marrow cells from *IDH2*^{R140Q}-engrafted mice suffering from MPN (left panel), T-cell (middle panel) and B-cell (left panel) lymphoma. Live cells were gated using forward and side scatter and further gated on GFP-positivity. **(b)** Haematoxylin and eosin (H&E)-stained thymus, sternum, liver and spleen from mouse suffering from a T-cell lymphoma. Thymus; diffuse proliferation of malignant T cells with artery involvement ($\times 100$); lymphoid cells with hyperchromatic nuclei and prominent nucleoli (apoptotic bodies are indicated by an arrow) ($\times 630$). Sternum; homogeneous invasion of the medullar space by the T-cell proliferation ($\times 100$). Liver; invasion of the portal space by the same proliferation. Spleen; persistence of a follicular-like structure within the T-cell proliferation ($\times 100$); coexistence of the proliferation (left) and residual splenic tissue (right) ($\times 630$). **(c)** Dot blotting with antibody against 5hmC of non-malignant (spleen; MSCV-engrafted mouse) and malignant cells (spleen; MPN and T-cell lymphoma-affected *IDH2*^{R140Q}-engrafted mice). Signal intensity of each dot was determined using the ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Histogram shows the relative levels of 5hmC in the three samples. **(d)** Serum samples from *IDH2*^{R140Q}-engrafted mice were analyzed for their content in 2-HG over time. The gray, dot-delimited region of the plot defines the normal range of 2-HG serum values (less than $4 \mu\text{mol/l}$) measured in non-leukemic mice. GFP, green fluorescent protein; 2-HG, 2-hydroxyglutarate; 5hmC, 5-hydroxymethyl cytosine; MPN, myeloproliferative neoplasm; MSCV, murine stem cell virus.

shifts the cells to an earlier stage of differentiation.¹⁰ We then studied by flow cytometry the myeloid and lymphoid potential of murine primary LSK cells when transduced with the *IDH2*^{R140Q} or empty retroviruses, upon coculture with murine MS5 stromal cells used for long-term support of hematopoiesis. Upon 17 days of culture, *IDH2*^{R140Q}-transduced cells showed a major decrease in cell surface expression of the erythroid Ter119 and B lymphoid B220 markers when compared with their MSCV-transduced counterparts, indicating that the mutation restrains LSK differentiation into myeloid and lymphoid lineages (Figure 1 and Supplementary Figure 1a). Sorted 5-fluorouracil-pretreated murine primary lin[−] cells were next transduced with the *IDH2*^{R140Q} and empty constructs and transplanted into sublethally (9.5 Gy) irradiated mice ($n=20$) to investigate the biological activity of *IDH2*^{R140Q} *in vivo*. Mice that received empty vector-transduced cells ($n=4$) remained free of disease during the observation period. Seven out of 20 mice engrafted with *IDH2*^{R140Q}-transduced stem/progenitor cells remained free of hematological disorder after transplantation, indicating partial penetrance of the disease. Among symptomatic *IDH2*^{R140Q} mice ($n=13$), two groups could

be distinguished on the basis of latency and nature of the illness (three *IDH2*^{R140Q}-engrafted mice died before being analyzed around week 20 after transplantation and were excluded). In the first group (4/13; 30%), animals succumbed to an aggressive disease between weeks 20 and 24, characterized by leukocytosis, anemia, thrombocytopenia and splenomegaly (Supplementary Figure 1b and see Supplementary Table 1 for hematological parameters during follow-up). Histological and flow cytometry analyses showed a major infiltration of hematopoietic (BM, spleen, thymus) and non-hematopoietic (liver, lung, kidney) tissues by GFP-positive malignant cells (Figures 2a and b). Two mice had typical features of myeloproliferative neoplasm (MPN)-like disease (Mac-1+ or Mac-1+Gr-1+ cells) and the remaining two developed B-cell (B220+) and T-cell (CD3+) lymphoma. The B-cell neoplasm corresponded to a highly aggressive medium-sized cells lymphoma with an important mitotic activity, infiltrating extensively the bone marrow and partially the liver and the spleen (Figure 2a and Supplementary Figure 2). For the T-cell neoplasm, the proliferation was diffuse, with a complete destruction of the thymic architecture, showing a uniform

population of medium-sized cells with mainly round nuclei, central nucleoli and a fine chromatin, suggesting a Precursor T-cell lymphoma; apoptotic foci were prominent (Figure 2b). The bone marrow was involved by the same diffuse proliferation, with some remaining megakaryocytes. The spleen exhibited a partial involvement of the parenchyma; foci of follicles were visible and megakaryocytes were present. Some tumoral lymphoid foci were found within perivascular areas of the liver (Figure 2b). These data show for the first time the emergence of lethal lymphoid proliferations upon *IDH2*^{R140Q} expression in a mouse model. We also obtained evidence for an association between *IDH1*^{R132H} expression and T-cell lymphoma development using a bone marrow transplant (BMT) approach (data not shown). This prompted us to ask whether *IDH2*^{R140Q} could impact TET proteins activity and subsequently affect the 5-hydroxymethyl cytosine (5hmC) content in malignant lymphoma cells, as reported in myeloid tumors.^{6,12} Analysis of global levels of 5-methylcytosine (5mC) and 5hmC by dot blotting of DNA extracted from normal spleen and their infiltrated counterparts showed no significant difference in the level of 5mC (not shown) while a strong reduction was observed in the level of 5hmC in spleens, which had an elevated content of malignant cells for mice with both MPN and T-cell lymphoma (Figure 2c). This observation indicates that inhibition of TET functions by a mutant *IDH2* also happens in a lymphoid context. In the second group of *IDH2*^{R140Q}-engrafted mice (6/13; 46%), animals developed a myelodysplastic syndrome (MDS)-like disease with signs of dysplasia of the erythroid and megakaryocytic series; sick mice displayed severe anemia ($6.56 \pm 1.56 \times 10^6$ red blood cells/mm³) and thrombocytopenia ($398 \pm 116 \times 10^3$ platelets/mm³) at the time of killing (Supplementary Figure 1c and see Supplementary Table 1 for hematological parameters during follow-up). In this group, mice health was monitored twice a month and animals were killed at the first sign of pain. Data from the second group are consistent with the *IDH2*^{R140Q} knock-in (KI) mouse model recently reported by Chen *et al.* where the mutation produces an MDS-like state (a disease in which *IDH* mutations are present in 4–12% of samples in human) that did not progress to leukemia.¹² High c-kit staining (Supplementary Figure 1d) was also consistent with *in vitro* models^{6,9} and similar to the above study that showed an enhanced proportion of c-kit⁺ cells in the BM of recipient mice engrafted with *IDH2*^{R140Q}-transduced BM stem/progenitor cells.¹² We also asked whether *IDH2*^{R140Q}-neoplasms display increased levels of serum 2-HG as observed in human AMLs^{2–4} and mouse models.¹² For that purpose, serum 2-HG production was monitored in animals suffering from MDS (*n* = 2), MPN (*n* = 1) and T-cell lymphoma (*n* = 1) over time (Methods as reported in Janin *et al.*⁴). Data showed that metabolite concentration were higher than in control mice, and correlated with severity of the disease and with leukocytosis (Figure 2d and Supplementary Table 1). In line, we recently demonstrated that serum 2-HG levels correlate with mutation burden and tumor mass in *IDH*-mutated human AMLs.⁴

Our data establish that *IDH2*^{R140Q} is sufficient to initiate hematological malignancies from myeloid and lymphoid origin. In keeping with recent reports on *IDH1*^{R132H} and *IDH2*^{R140Q} KI mice models,^{11–13} the incomplete penetrance and long latency observed in our engrafted mice cohort confirm that additional mutations are required for complete transformation of hematopoietic cells and full-blown neoplasia. Genome-wide analysis of myeloid and lymphoid proliferations should help to identify the cooperating genetic alterations promoting neoplasia. The reasons for the difference between our BMT model and the KI model developed by Chen *et al.*¹² in terms of type of malignancy and kinetics of disease development are unexplained at present but could be related to a difference in expression levels of the mutant. Indeed, it has been reported that *IDH1*^{R132H}-mediated promotion of growth factor independence in the TF-1 cell line relies on 2-HG level.⁹ It will be critical to understand the

relationship between *IDH2*^{R140Q} activity, 2-HG levels and disease state in order to assess the clinical benefit of inhibition of *IDH2*^{R140Q}-mediated 2-HG production by small molecules¹⁰ for patients suffering from myeloid and T-lymphoid neoplasms associated with mutant *IDH2*.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Jacques Bosq for thoughtful discussions, Philippe Rameau (PFIC, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France) for cell-sorting cytometry, mice facility staff (Institut Gustave Roussy, Villejuif, France) and Audrey Joffrain for technical assistance. This work was supported by grants from INSERM, the Institut National du Cancer (INCa), the Cancéropôle Ile de France and the Association Laurette Fugain. MD is funded by a fellowship from the INCa (INCa-DGOS_5733).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

EM, OAB, CO, SDB and VPL designed research, analyzed data and wrote the manuscript. MJ performed the dosage of 2-HG. OB and PO carried out the histological analysis. MD and CQ performed the measure of 5mC and 5hmC content. All the authors read and approved the manuscript.

E Mylonas^{1,2}, M Janin^{3,4}, O Bawa⁵, P Opolon⁵, M David^{1,2},
C Quivoron^{1,2}, OA Bernard^{1,2}, C Ottolenghi^{3,4},
S DeBotton^{1,2} and V Penard-Lacronique^{1,2}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)
U985, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France;

²Université Paris Sud-11, Orsay, France;

³Biochimie métabolique, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris
(AP-HP), Groupe Hospitalier Necker-Enfants Malades,
Paris, France;

⁴INSERM U747, Université Paris Descartes, Paris, France and

⁵Plateforme d'évaluation préclinique, Institut Gustave Roussy,
Villejuif, France

E-mail: virginie.penard-lacronique@inserm.fr

REFERENCES

- Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM *et al.* Cancer-associated *IDH1* mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 2009; **462**: 739–744.
- Gross S, Cairns RA, Minden MD, Driggers EM, Bittinger MA, Jang HG *et al.* Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. *J Exp Med* 2010; **207**: 339–344.
- DiNardo CD, Probert KJ, Loren AW, Paietta E, Sun Z, Levine RL *et al.* Serum 2-hydroxyglutarate levels predict isocitrate dehydrogenase mutations and clinical outcome in acute myeloid leukemia. *Blood* 2013; **121**: 4917–4924.
- Janin M, Mylonas E, Saada V, Micol JB, Renneville A, Quivoron C *et al.* Serum 2-hydroxyglutarate production in *IDH1*- and *IDH2*-mutated de novo acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association Group. *J Clin Oncol* 2014; **32**: 297–305.
- Losman JA, Kaelin WG. What a difference a hydroxyl makes: mutant *IDH*, (R)-2-hydroxyglutarate, and cancer. *Genes Dev* 2013; **27**: 836–852.
- Figuerola ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A *et al.* Leukemic *IDH1* and *IDH2* mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* 2010; **18**: 553–567.
- Lu C, Venneti S, Akalin A, Fang F, Ward PS, Dematteo RG *et al.* Induction of sarcomas by mutant *IDH2*. *Genes Dev* 2013; **27**: 1986–1998.
- Rohle D, Popovici-Muller J, Palaskas N, Turcan S, Grommes C, Campos C *et al.* An inhibitor of mutant *IDH1* delays growth and promotes differentiation of glioma cells. *Science* 2013; **340**: 626–630.
- Losman JA, Looper RE, Koivunen P, Lee S, Schneider RK, McMahon C *et al.* (R)-2-hydroxyglutarate is sufficient to promote leukemogenesis and its effects are reversible. *Science* 2013; **339**: 1621–1625.
- Wang F, Travins J, DeLaBarre B, Penard-Lacronique V, Schalm S, Hansen E *et al.* Targeted inhibition of mutant *IDH2* in leukemia cells induces cellular differentiation. *Science* 2013; **340**: 622–626.

- 11 Sasaki M, Knobbe CB, Munger JC, Lind EF, Brenner D, Brustle A *et al.* IDH1(R132H) mutation increases murine haematopoietic progenitors and alters epigenetics. *Nature* 2012; **488**: 656–659.
- 12 Chen C, Liu Y, Lu C, Cross JR, Morris 4th JP, Shroff AS *et al.* Cancer-associated IDH2 mutants drive an acute myeloid leukemia that is susceptible to Brd4 inhibition. *Genes Dev* 2013; **27**: 1974–1985.
- 13 Chaturvedi A, Araujo Cruz MM, Jyotsana N, Sharma A, Yun H, Gorlich K *et al.* Mutant IDH1 promotes leukemogenesis in vivo and can be specifically targeted in human AML. *Blood* 2013; **122**: 2877–2887.
- 14 Cairns RA, Iqbal J, Lemonnier F, Kucuk C, de Leval L, Jais JP *et al.* IDH2 mutations are frequent in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood* 2012; **119**: 1901–1903.

Supplementary Information accompanies this paper on the Leukemia website (<http://www.nature.com/leu>)

Improved long-term survival in multiple myeloma up to the age of 80 years

Leukemia (2014) **28**, 1346–1348; doi:10.1038/leu.2014.23

In the Western world, the annual age-adjusted incidence for multiple myeloma is 4.8 to 8 per 100 000.¹ The median age at diagnosis is approximately 70 years and is only occasionally diagnosed in persons aged below 40 years.² In recent years, several new therapeutic agents with novel mechanisms of action have been approved by the FDA for multiple myeloma such as lenalidomide, pomalidomide, bortezomib and carfilzomib.³ According to randomized clinical trials, survival has improved with these drugs. Importantly, randomized clinical trials are inherently subject to selection bias owing to strict inclusion and exclusion criteria, often with omission of elderly patients.^{2,4,5} Population-based studies are effective to estimate survival changes over time in a non-selected group of persons.⁶

In 2007, using population-based data from Sweden on 14 381 multiple myeloma patients, we were the first to show that multiple myeloma survival has improved in the general population,² which was later confirmed by other studies.^{2,7–10} In fact, several population-based studies in multiple myeloma have consistently shown that the improvements in survival over the last years are restricted to the younger multiple myeloma patients (below the age of 65–70 years) and that elderly patients have not benefitted from the introduction of the new drugs. This, in turn, suggests that high-dose melphalan therapy followed by autologous stem cell transplantation has been the main driver for the observed improvement in survival in population-based multiple myeloma studies.^{2,8} However, the use of modern drugs among older patients is a relatively new phenomenon, and, until date, no population-based study with sufficient follow-up has been conducted to formally assess survival patterns in older multiple myeloma patients in the era of modern drugs.

In a recent follow-up study from the Mayo Clinic, based on 1038 multiple myeloma patients diagnosed during 2001–2010 at their single center, tertiary referral clinic, a continued improvement in survival was observed in recent years.¹¹ More specifically, the Mayo Clinic study found their improved survival patterns to be driven by 540 patients older than 65 years at diagnosis. In their study, median survival in patients older than 65 years improved from 3.2 to 5 years in patients diagnosed during 2001–2005 and 2006–2010, respectively. No improvement was observed for younger patients over time. In addition, there was a significant improvement in early mortality between the two calendar periods.

To follow-up on these findings from a single center, tertiary referral center, we performed a population-based study on

survival among more than 45 000 multiple myeloma patients (2/3 of the patients were 65 years or older) diagnosed during 1973–2009 analyzing short- and long-term survival. Information on all patients with multiple myeloma diagnosed from January 1973 through December 2009 was obtained using the NCI Surveillance Epidemiology and End Results 9 Registries Database (SEER 9, based on November 2011 submission).¹² Multiple myeloma was defined using International Classification of Disease for Oncology, 3rd edition (ICD-O-3) topographic (C42.1) and morphologic (9732) codes.¹³ The NCI SEER 9 data included SEER's original 9 Tumor Registries (Atlanta, Connecticut, Detroit, Hawaii, Iowa, New Mexico, San Francisco-Oakland, California, Seattle-Puget Sound, Washington and Utah), and covering approximately 10% of the US population.¹²

Survival was calculated for multiple myeloma as defined by ICD-8 to ICD-10 mortality codes. Data on the year of diagnosis, age and gender were available for each case. On the basis of advances in multiple myeloma diagnosis and treatment, myeloma patients were divided into four age groups (0–50, 51–65, 66–79 and ≥80 years) and four time-periods of diagnosis (1973–1979, 1980–1989, 1990–1999 and 2000–2009). Actuarial myeloma-specific survival rates with 95% confidence intervals were calculated using the Kaplan–Meier method. All statistical tests are two-sided, with $P < 0.05$ considered statistically significant.

There were 45 595 persons with multiple myeloma diagnosed from 1973 through 2009. The number of patients diagnosed in the calendar periods 1973–1979, 1980–1989, 1990–1999 and 2000–2009 were $n = 5509$, $n = 10\,325$, $n = 13\,408$, and $n = 16\,253$, respectively. The number of patients in the age groups of 0–50, 51–65, 66–79 and 80–106 years were 3783, 13 010, 19 370 and 9332, respectively. Overall, for all age groups, short-term (3 months) survival improved significantly over time (1973–2009) ($P < 0.05$). Among patients under the age of 50 years (Figure 1), cumulative percent (%) five-year myeloma-specific survival improved statistically significantly ($P < 0.05$) over time; ranging from 36% during 1973–1979, to 46% during 1980–1989, to 56% during 1990–1999, to 68% from 2000–2009. Similarly, there was a significant improvement in 5-year survival among patients in the age groups of 51–65 years (34, 38, 44 and 58%) and 66–79 years (26, 32, 32 and 41%), respectively.

Ten-year survival improved statistically significantly over time in patients under the age of 50 years at the time of multiple myeloma diagnosis: that is, 20, 26 and 41% during the calendar periods 1973–1979, 1980–1989 and 1990–1999, respectively ($P < 0.05$; Figure 1). Similarly, there was a statistically significant improvement in 10-year survival among persons in the age groups of 51–65 years (15, 17 and 25%) and 66–79 years (12, 12 and 15%) at the time of multiple myeloma diagnosis. In contrast, no

1.5 Résultats et discussion

Nos travaux établissent plusieurs points importants :

- nous avons défini les valeurs sériques de 2-HG permettant de discriminer la présence d'une mutation *IDH* dans le(s) clone(s) leucémique (s) (> 2 mmol/L) pour un seuil de sensibilité de 100% et de spécificité de 79% ; dans le cas du rapport entre les deux énantiomères (D/L), le seuil de spécificité atteint 83% pour une sensibilité de 100%. Le taux sérique de ce biomarqueur est donc prédictif de la présence de la mutation *IDH* et la discrimination des formes D et L augmente la spécificité de la mesure ;
- le taux sérique de 2-HG corrèle avec la nature de la mutation *IDH* présente dans les LAMs, les LAMs avec mutation *IDH2 R172K* généralement associée à des LAM réfractaires présentant les taux les plus élevés ;
- le taux sérique de 2-HG est prédictif du statut clinique des patients (rémission, réfractaire, rechute, échec thérapeutique);
- il existe une très forte corrélation entre le taux sérique de 2-HG et la charge allélique (mesurée par séquençage à haut débit) et la masse tumorale;
- de même, il existe une très forte corrélation entre le taux sérique de 2-HG et l'expression des marqueurs *NPM1* (présence de la mutation) et *WT1* (taux de transcrits), suggérant que le 2-HG pourrait constituer un marqueur de suivi de la maladie résiduelle des LAMs sans anomalie *WT1* ou *NPM1* ;
- enfin, après une première induction, un taux sérique de 2-HG < 2 mmol/L corrèle avec la survie sans événements (dosages séquentiels réalisés sur 35 patients en post-induction avec LAM mutée *IDH*; suivi médian de 2,9 ans).

En résumé, les résultats de cette étude montrent que le dosage d'un composé métabolique dans le plasma (le D-2-hydroxyglutarate) permet de prédire le génotype d'une hémopathie maligne (mutations *IDH*) avec une très grande précision, et peut permettre de corriger des faux négatifs (obtenus par étude moléculaire) ; il permet de monitorer les cellules cancéreuses au cours du suivi de la maladie (corrélation avec les états réfractaires ou les rechutes), et a une valeur pronostique significative et supérieure aux autres marqueurs moléculaires connus.

J'aimerais rajouter un commentaire sur un point qui n'apparaît pas dans la publication : notre capacité à distinguer et quantifier les stéréoisomères de l'acide 2-hydroxyglutarique dans de petits volumes de plasma ou de sérum (40-100 μ L), n'a été possible que par le couplage de la chromatographie en phase gazeuse à une détection en tandem MS, donc par une double fragmentation (dans la source et dans la cellule de collision ; cf annexe 10). Le

développement d'une telle méthode n'a donc été possible que grâce à l'acquisition d'un appareil de type triple quadripôle (GC-MSMS).

Ce type d'appareil est encore très peu utilisé en France, à la fois en milieu hospitalier (où la sensibilité et spécificité des GCMS traditionnels sont considérées comme suffisantes pour l'étude des maladies métaboliques héréditaires) et dans les plateformes de recherche. Une raison de cette pénurie est que les dosages ciblés des acides organiques comme d'autres composés (par opposition aux études non-ciblés à large spectre) peuvent se faire plus aisément par LC-MSMS que par GC-MSMS ; certaines plateformes de recherche ne disposent d'aucun appareil GC-MS.

Pour cette raison, suite à notre étude pilote, le service de pharmacologie de l'IGR (dirigé par le Dr. Angelo Paci) a mis en place un dosage de D-2-HG plasmatique par LC-MS, ce qui lui permet d'assurer actuellement la grosse activité de diagnostic et de suivi des cancers associés aux mutations *IDH* sur place. Néanmoins, un désavantage des approches en LC-MSMS, en dehors du caractère nécessairement ciblé de leurs analyses, est qu'elles nécessitent un développement initial plus important, et qu'elles se révèlent souvent moins robustes, du fait d'effets matrice importants et imprévisibles. Ainsi, pour notre étude pilote, il a probablement été une bonne idée d'utiliser une technique en GC-MS, ce qui n'a pu, néanmoins, être efficace que par la technologie, relativement nouvelle, de la GC-tandem MS.

Concernant les modèles murins présentés dans la seconde publication, ceux-ci nous ont permis de montrer que la mutation *IDH2 R140Q* est suffisante pour induire l'apparition d'hémopathies dans les lignées lymphoïdes et myéloïdes, mais avec une pénétrance incomplète et une longue latence, indiquant la nécessité de coopération oncogénique, à l'image des modèles KI publiés dans la littérature.

2. Analyse métabolomique dans un modèle d'acidurie D-2-hydroxyglutarique

Le but de cette étude a été d'explorer les effets d'un inhibiteur dirigé contre une forme mutante *IDH2*, sur des fibroblastes primaires en culture issus d'un jeune patient atteint d'acidurie D-2-hydroxyglutarate, une maladie héréditaire du métabolisme extrêmement rare et résultant d'une mutation constitutionnelle *IDH2 R140Q*. Le patient que nous avons étudié est le seul patient vivant actuellement en France. Environ la moitié de ces malades sont porteurs de mutations inactivatrices affectant le gène *D2HGDH*, alors que, l'autre moitié est porteuse de la mutation *IDH2 R140Q*.

2.1 Matériel et méthode

a) Les fibroblastes

Pour cette étude, j'ai mis au point un protocole d'extraction adapté à l'analyse de ce type d'échantillon. Le protocole optimisé implique l'extraction par 400 µL de méthanol par culot comportant une étape de 2 fois 2 minutes de vortex (GenieDisruptor), suivi d'une centrifugation de 10 minutes à 10 000 RPM pour former un culot de débris cellulaire. Le surnageant est ensuite transféré dans un tube Eppendorf de 1,5 mL propre. Différentes concentrations en cellules ont été testées, allant de 3 millions à 100 000 cellules. Le surnageant est transféré en tube en verre de 6 mL avant d'être séché totalement au Speed Vacuum, puis silylé (cf protocole de silylation en annexe 5). Une concentration satisfaisante a été déterminée à 1 million de fibroblastes par culot.

2.2 Protocole

a) Mise en culture

Les fibroblastes primaires du patient et des fibroblastes d'un patient témoin ont été mis en culture dans des conditions standards à 37°C, dans un milieu de culture pauvre en nutriments utilisé en routine hospitalière pour induire un stress cellulaire, ceci pouvant faciliter la mise en évidence de déficits métabolique.

b) Conditions de cultures

Les cellules ont été cultivées pendant 2 jours en flasque de 75 cm² (T75) avec 20 mL de milieu. Les cellules sont ensuite réparties en plaques de culture suivant le plan ci-après :

Temps d'incubation	Traitements				
Jour 2	DMSO	Sans rien	0.1 µM AGX	0.5 µM AGX	2.5 µM AGX
Jour 4					
Jour 7					

Tableau 3 : Conditions de traitement des fibroblastes du patient avec une acidurie et du contrôle.

DMSO = Dimethyl sulfoxide; AGX = inhibiteur Agios AG-221 spécifique de la mutation *IDH 2*.

Ces conditions ont été appliquées aux deux lignées de fibroblastes, ce qui représente 30 échantillons au total.

c) Traitement des échantillons

A la fin du temps d'incubation, les surnageants sont récupérés dans des tubes falcon de 15 mL, et les cellules sont tout d'abord lavées au PBS, puis décollées rapidement à l'aide de trypsine (1 minutes environ, 3 mL). Enfin, les cellules sont transvasées en tube Eppendorf de 1.5 mL, centrifugées 5 minutes à 1500 RPM pour constituer un culot. Le surnageant est retiré, les cellules sont lavées avec 1 mL de PBS avant une nouvelle phase de centrifugation.

Les culots secs obtenus sont congelés à -80°C.

Un volume de 900 µL de méthanol est additionné aux culots secs directement dans les tubes Eppendorf. L'extraction s'effectue suivant le mode opératoire suivant :

- Vortex 2 fois 4 minutes au GenieDisruptor (Scientific Industries).
- Centrifugation 10 minutes à 10 000 RPM dans centrifugeuse pour tube Eppendorf.
- Récupération du surnageant par transfert dans un tube Eppendorf de 1.5 mL propre.
- Conservation à -80°C avant préparations pour analyse.

Analyses GC MS

Analyse métabolomique non ciblée

Un tiers du volume d'extraction / précipitation des protéines au méthanol fut utilisé pour analyser les métabolites de ces échantillons par GC-MS. Les deux tiers restants ont été analysés par deux techniques en LC-MS (présentées plus loin).

Ce volume de 300 µL est transféré dans un tube à hémolyse en verre de 6 mL. On ajoute un mix d'étalons internes détaillé en annexe 7.

Ensuite est réalisé un séchage de ces extraits au Speed Vacuum (1 heure environ) et une silylation (cf protocole en annexe 5).

Le passage en GC/MS est réalisé en modes d'analyse Full Scan (FS; analyse ciblée et non ciblée), Single Ion Monitoring (SIM; idem) ou encore Multiple Reaction Monitoring (MRM). Voir l'explication de ces différents modes en annexe 10.

Analyse de flux métabolique

D'autre part, nous avons effectués des tests fonctionnels pour étudier certains flux métaboliques en incubant les fibroblastes en présence de traceurs marqués, notamment la glutamine $^{13}\text{C}_5$ (1 mM, en présence de glucose 2.5 mM) et le palmitate $^{13}\text{C}_{16}$ (0.1 mM, en l'absence de glucose). Les milieux d'incubations comprenaient de la BSA, et de la BSA + carnitine pour la charge en palmitate. Les durées d'incubation étaient de 2 et 6 heures. Les dosages des acides organiques et acides aminés ont été effectués en GC-tandem MS et les dosages des acylcarnitines ont été faits en collaboration avec le Dr. Florence Habarou, par LC-tandem MS (API3000, AbiSciex) selon un protocole hospitalier adapté.

Analyses LC MS

Collaboration

Les analyses en chromatographie liquide (LC; voir annexe 9) couplées à un spectromètre de masse (MS; voir annexe 10) ont été réalisées au CEA (Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives) de Saclay (France) dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. Christophe Junot (directeur du LEMM : Laboratoire d'étude du métabolisme des médicaments) et sous la supervision de Sandrine Aros-Calt et Florence Castelli. Le but était d'étendre les classes de métabolites étudiés pour ces mêmes échantillons.

Expérimentation

La préparation des échantillons a consisté essentiellement en l'élimination des protéines par précipitation au méthanol (étapes initiales). Deux volumes de 150 μL de chaque échantillon ont été transférés en tube Eppendorf propres annotés avant d'être séchés au Speed Vacuum. Par ailleurs, 100 μL de chaque échantillon fut transféré dans un tube Eppendorf de 5 mL (30 échantillons x 100 μL = 3 mL au total). Ce volume est vortexé puis séparé dans 4 tubes Eppendorf de 1.5 mL (750 μL dans chaque). Ces 4 tubes m'ont servi à réaliser la mise au point des analyses d'extraits de fibroblastes sur LC MS (choix de la concentration optimale principalement). La chaîne LC était au départ une chaîne Shimadzu (passage des échantillons avec une colonne ZIC-HILIC) puis elle fut remplacée pour des problèmes de pression par une chaîne Dionex Ultimate 3000. L'analyseur de spectrométrie de masse était un Exactive (Thermo).

Choix des colonnes

Pour une analyse métabolomique la plus large possible, nous avons choisi de passer ces échantillons sur une première colonne ZIC-HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography; SeQuant) permettant, par les faibles interactions entre les métabolites

chargés et la phase stationnaire neutre zwitterionique, une bonne sélectivité pour les composés polaires et hydrophiles : sucres, métabolites de petite taille, acides et bases organiques, acides aminés, peptides entre autres. Les deux modes, négatif et positif, ont été utilisés afin d'augmenter le nombre total de composés identifiés.

Dans un second temps, j'ai passé la deuxième série d'extraits sur une colonne PFPP (Phase stationnaire constituée de pentafluorophenylpropyl). Cette colonne contient différents groupements permettant l'analyse de nucléosides, nucléotides, purines, pyrimidines.

Solvants d'élution et gradients

Pour la méthode en ZIC-HILIC, le gradient d'élution était le suivant :

Solvant A	Solvant B	Temps (minutes)
20 %	80 %	0.01
20 %	80 %	2.00
60 %	40 %	12.00
100 %	0 %	12.01
100 %	0 %	17.00
20 %	80 %	17.01
20 %	80 %	42.00

Solvant A : Carbonate d'ammonium 10mM dans l'eau ajusté à pH 10.5 avec de l'hydroxyde d'ammonium.

Solvant B : 100 % Acétonitrile (ACN).

Le débit était constant à 0.200 mL par minutes et le volume injecté était de 10 µL.

Pour la méthode avec une colonne PFPP, le gradient était le suivant :

Solvant A	Solvant B	Temps (minutes)
95 %	5 %	0.01
95 %	5 %	2.00
0 %	100 %	20.00
0 %	100 %	24.00
95 %	5 %	24.01
95 %	5 %	30.00

Solvant A : 100 % eau (0.1% acide formique).

Solvant B : 100 % ACN (0.1% acide formique).

Le débit était constant à 0.250 mL par minutes et le volume injecté était de 10 µL.

La séquence d'échantillons se composait de la façon suivante :

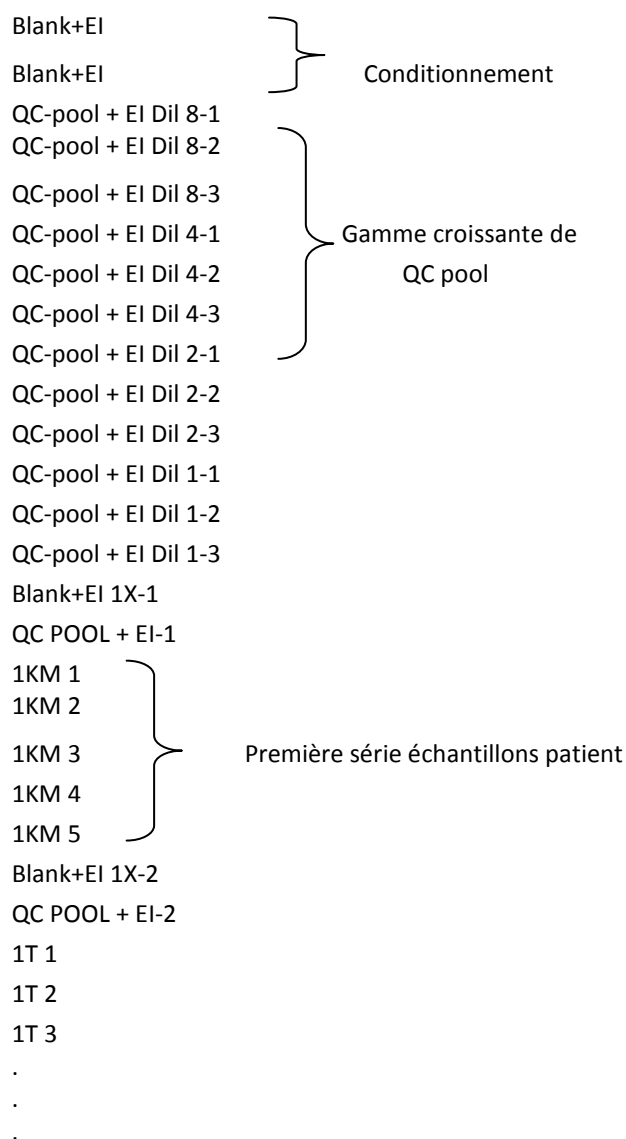


Figure 9 : Exemple de séquence d'analyse.

Blank : échantillons phase A; QC pool : pool des échantillons, KM ou T : enchainement de 5 échantillons des patients.

Analyse de profils chromatographiques

Le logiciel d'interfaçage est XCalibur de Thermo Fisher Scientific (Les Ulis, France). Le spectromètre de masse a été étalonné avant chaque analyse en utilisant une solution d'étalonnage fournie par le fabricant (calibration externe). Les profils chromatographiques

ont été analysés par le logiciel XCMS (package de R) afin d'éliminer le bruit de fond et d'aligner les pics détectés. Un autre package R a été développé au sein du LEMM afin d'annoter les pics en utilisant les bases de données publiques (KEGG, METLIN, HMDB). Les paramètres de sensibilité de l'annotation peuvent être modifiés (j'ai pour ma part utilisé un décalage de 0ppm et une précision de 5ppm).

J'ai par la suite nettoyé les résultats en fonction de différents paramètres en supprimant :

- les coefficients de corrélation des "QC EI" inférieurs à 0.3,
- moyenne des signaux des échantillons biologiques divisée par la moyenne des échantillons "Blank" supérieure à 3 et "#DIV0",
- valeurs absolues du coefficient de corrélation des échantillons "dil QC" supérieures à 0.5

2.4 Résultats et Discussion

La stratégie d'analyse métabolomique que nous avons suivie a été de combiner deux approches en LC-MS en plus de la GC-MS pour couvrir un éventail de composés aussi large que possible (cf . diagramme de Venn ci-après).

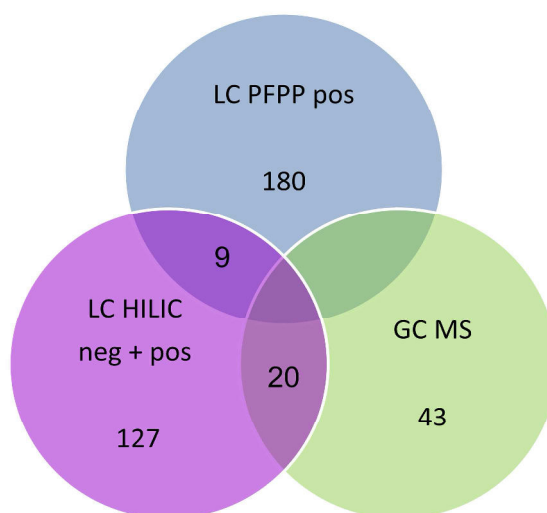


Figure 10 : Diagramme de Venn de la répartition des métabolites en fonction de la technique d'analyse.

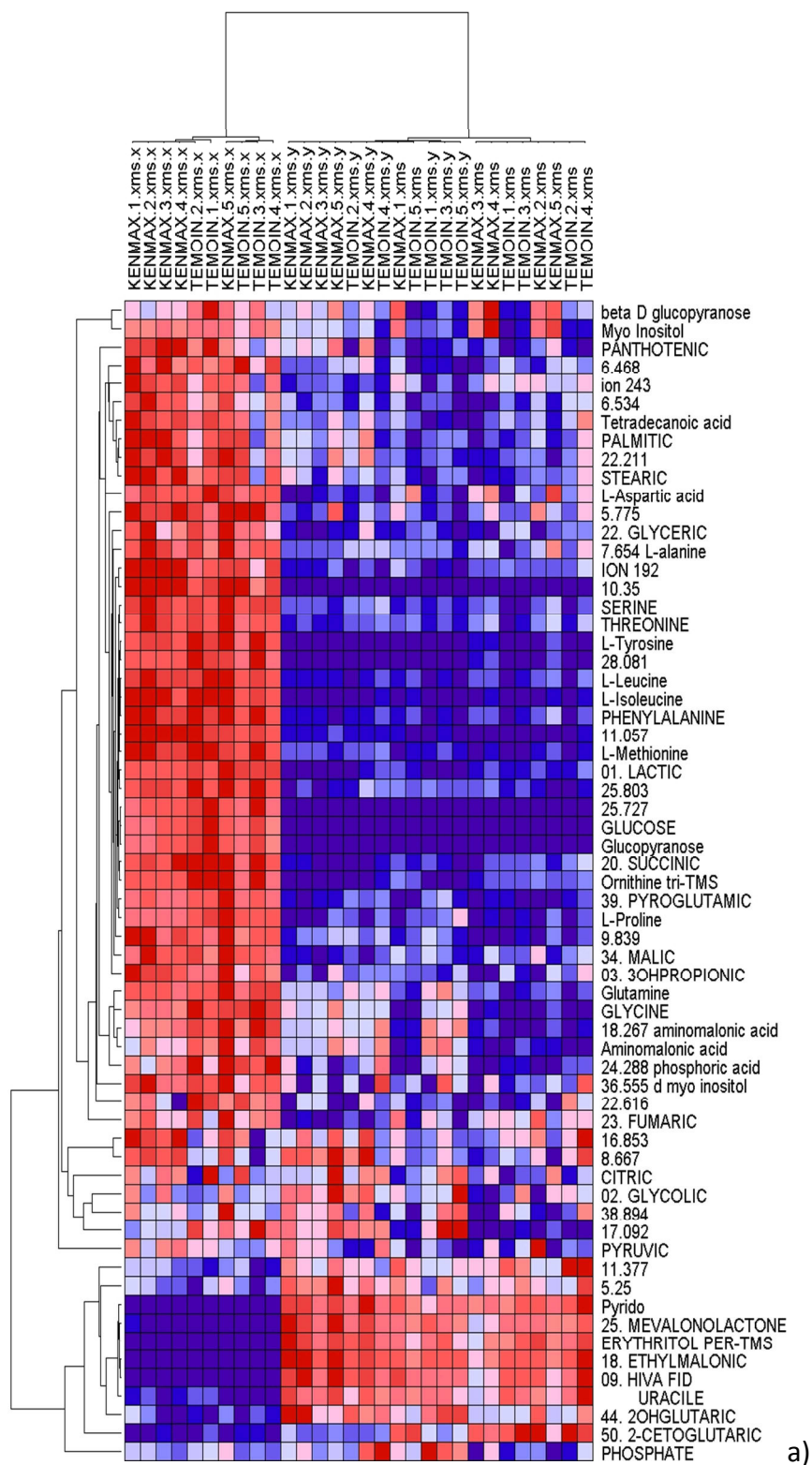
Ont été détectés 63 composés en GCMS, 189 en LC PFPP et enfin 156 en LC HILIC pour un total de 408 composés.

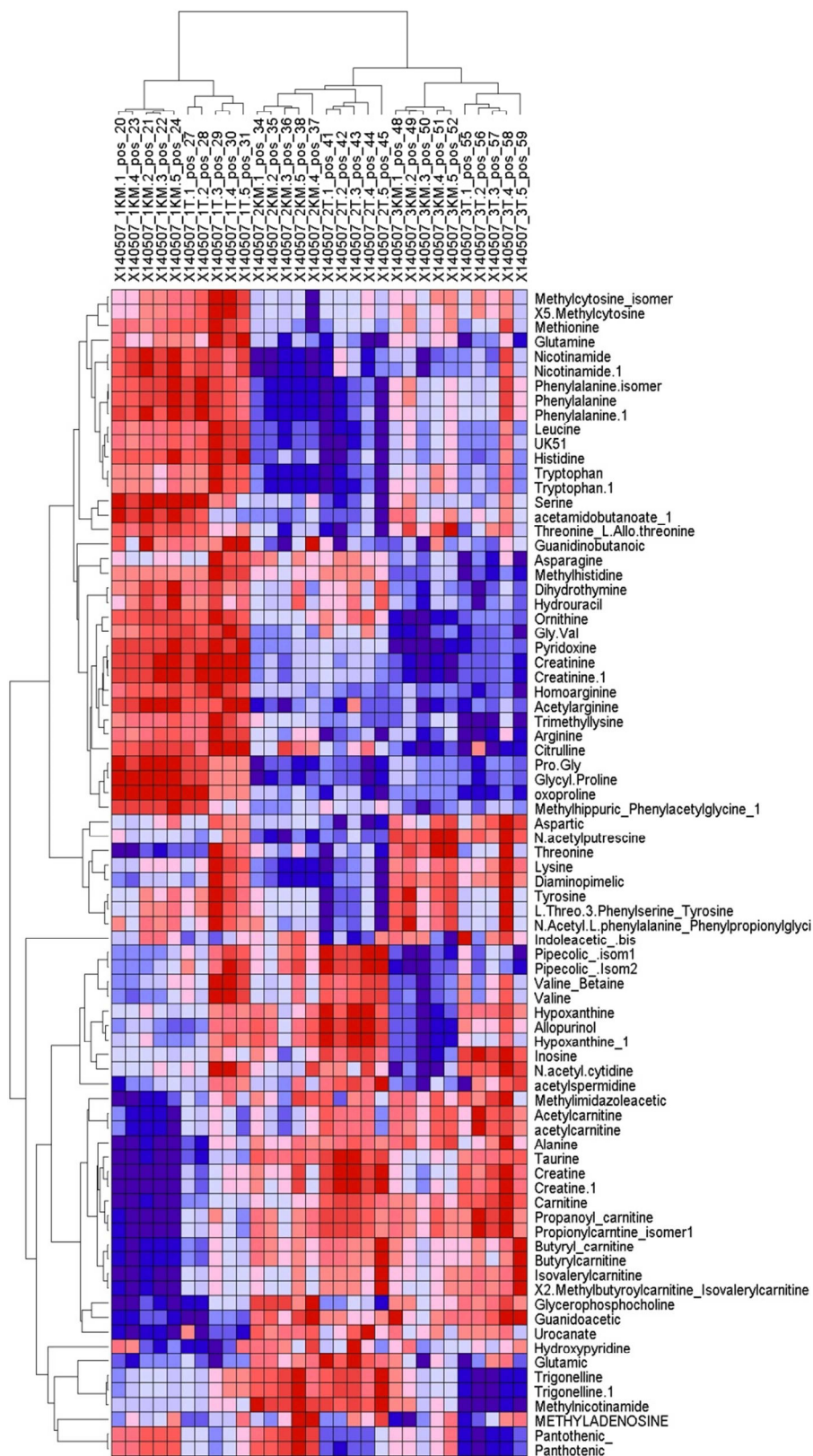
Le nombre de métabolites détectés et identifiés (sauf en GC MS pour laquelle une partie des composés non identifiés ont été gardés du fait de la richesse et donc spécificité inhérente aux spectres GC-MS) a été de 76 (LC HILIC négative Orbitrap), 80 (LC HILIC positive Orbitrap), 189 (PFPP positive Orbitrap) et 63 (GC MS) métabolites par chacune des techniques. La somme des différents métabolites en LC HILIC neg + pos identifiés étant de 156.

Les résultats pour les métabolites analysés par deux ou trois techniques différentes corrélaient très bien. Ceci nous conforte en ce qui concerne le développement de nos procédures d'extractions, de conservation des échantillons et d'analyse quel que soient les méthodes.

J'ai étudié les effets liés à l'inhibiteur en comparant d'abord deux conditions « non traitées » (DMSO et sans rien) à trois conditions « traitées » (gamme de concentration en inhibiteur) analysées à trois temps de culture (2, 4 et 7 jours). Les variations des intensités de signal normalisées pour l'ensemble des métabolites sont représentées par des « heatmaps » dans la figure 11, et montrent des variations très importantes en fonction du temps de culture. Cela peut se mesurer par une analyse en composantes principales (figure 12), montrant que les deux axes principaux expliquent environ 67% de la variance globale, et qu'ils distinguent les jours de culture beaucoup plus que le génotype ou l'effet du traitement.

Je souhaite indiquer que certains métabolites identifiés se trouvent être des médicaments, comme l'allopurinol par exemple qui est un hypo-uricémiant utilisé dans le traitement de la goutte. Il est certain que les deux jeunes patients n'ont pas eu recours à ce traitement, cependant l'allopurinol est un isomère de position de l'hypoxanthine. Ces deux composés ont donc exactement la même masse, mais également des temps de rétentions proches. La grande similitude entre les profils de l'hypoxanthine et de l'allopurinol explique qu'ils aient été confondus dans la bibliothèque spectrale LC-MS utilisée.





b)

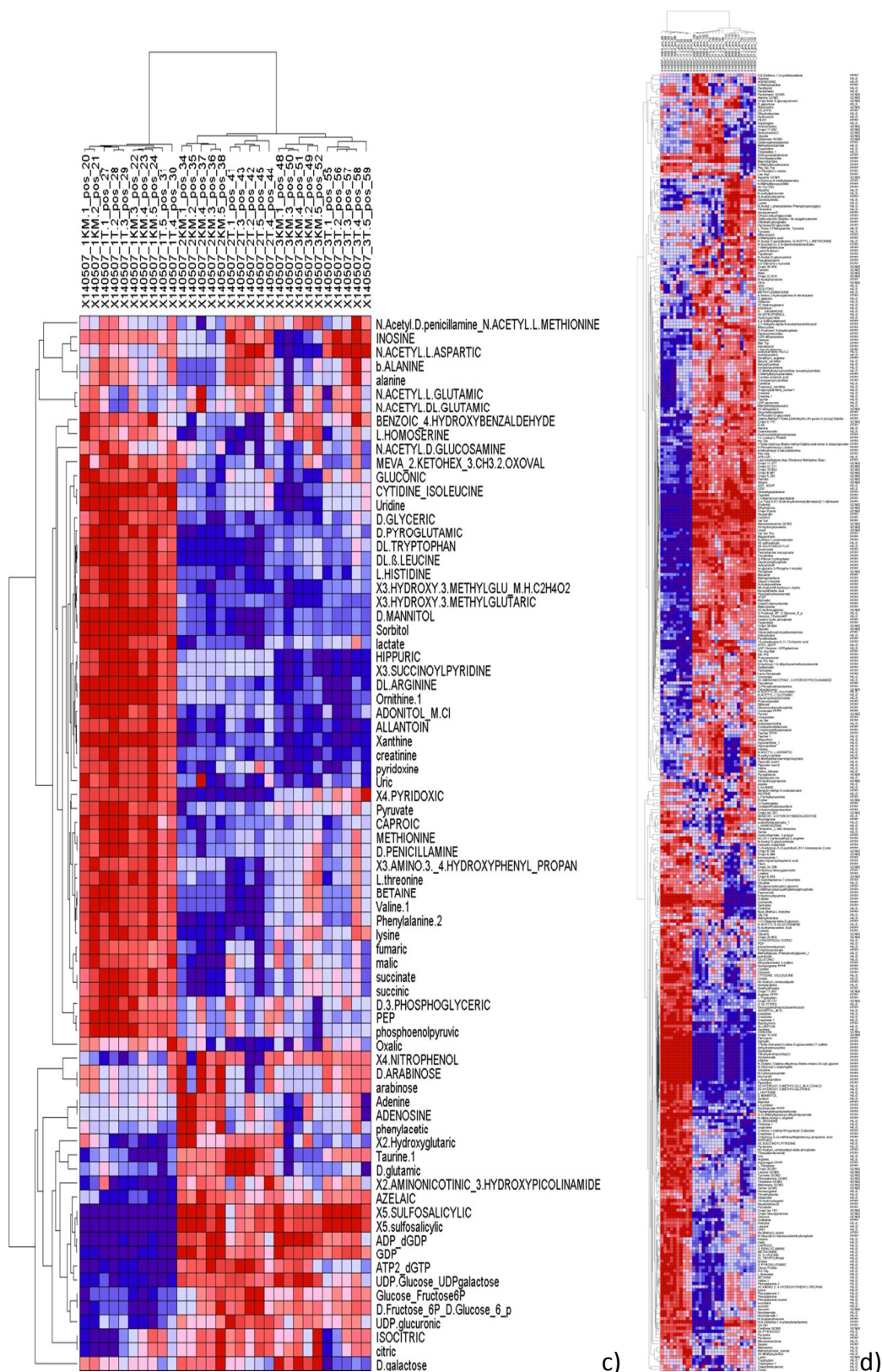


Figure 11 : Heatmaps des variations d'intensité de signal normalisées.

Analyse des métabolites détectés en chromatographie gazeuse et spectrométrie de masse a), en chromatographie liquide avec colonne HILIC en mode positif b) et en mode négatif c), et visualisation du heatmap des trois techniques réunies d). (cf également figure 10)

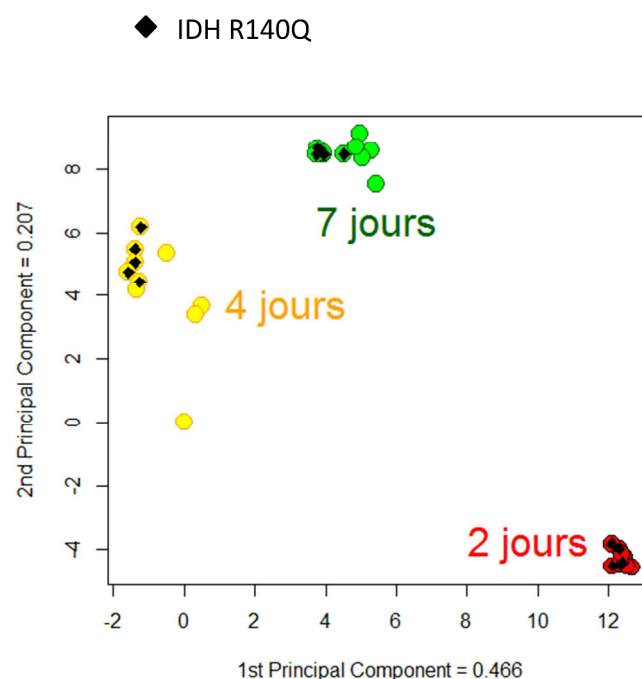


Figure 12 : Analyse en composante principale (PCA) de l'effet du temps de culture.

PC1+PC2 = 67% de la variance totale expliquée par le temps de culture. PC1 semble bien corrélérer avec le génotype (en stratifiant par le temps de culture)

En ce qui concerne l'effet du génotype (état de base chez les fibroblastes du patient acidurique vs témoin, en considérant ensemble tous les temps de culture), nous retrouvons des métabolites augmentés chez le patient acidurique, y compris le 2-HG (attendu), la mévalonolactone (suggérant que la mutation *IDH2 R140Q* induit une augmentation de la synthèse du cholestérol), une augmentation de plusieurs acides gras (notamment, palmitate et stéarate, suggérant que la mutation *IDH2 R140Q* induit une augmentation de la lipogénèse dans son ensemble), de dTDP (thymidine diphosphate), de certains tri- et dipeptides (notamment Trp-Arg-Met, qui est encore plus significativement augmenté que le 2-HG), et de l'arginine (tableau 4 et annexe 13). Les métabolites diminués dans les fibroblastes du patient acidurique comprennent la pyridoxine, l'acide pipécolique, la carnitine et certains dérivés acylcarnitines à chaînes courtes y compris l'acétylcarnitine, la taurine, la cytidine, la cytosine, la valine, l'ornithine, ainsi que le N-acétylaspartate (tableau 4 et annexe 13). La diminution de l'acétylcarnitine et de la carnitine pourrait suggérer un déficit partiel de l'oxydation des acides gras, mais cela devrait s'accompagner d'une augmentation des acylcarnitines à chaînes longues, ce qui n'est pas observé dans cette analyse à l'état stationnaire (cf. analyse de flux). Il est possible que la carnitine soit déplétée par d'autres processus qui accumulent des dérivés Co-A toxiques (détoxifiés par liaison à la carnitine). Néanmoins, le métabolisme du 2-HG n'implique pas de dérivés Co-A et son accumulation ne peut donc pas être directement en cause.

A)

Identifiant KEGG	METHODE	Nom officiel retenu	p.ttest	t	ratio
	PFPP	Trp Arg Met	0.000352	8.591126	3.133
C02630	HILIC	X2.Hydroxyglutaric	0.000660	7.515511	2.265
	GCMS	Cmpd ion 192	0.001457	6.324379	1.391
C00864	HILIC	Pantothenic	0.001460	6.321217	2.211
	PFPP	3-amino-octanoic acid	0.002359	-5.678154	0.496
C00408	HILIC	Pipecolic.Isom2	0.002765	-5.477032	0.619
C00314	HILIC	Pyridoxine	0.003299	-5.259941	0.713
C00408	HILIC	Pipecolic.isom1	0.003614	-5.150156	0.622
C00487	HILIC	Carnitine	0.003666	-5.133365	0.522
C02630	GCMS	X2-hydroxyglutaric	0.005494	4.667750	1.652
	GCMS	Mevalonolactone	0.005798	4.608075	1.220
C01677	PFPP	His Glu	0.006523	4.479316	1.792
C00870	HILIC	X4.NITROPHENOL	0.007954	4.267995	1.313
	GCMS	Cmpd ion 243	0.008350	4.217278	1.631
C01341	PFPP	E-64	0.009576	4.076154	2.970
C00475	PFPP	Cytidine	0.009796	-4.053005	0.604
C01909	PFPP	Dethiobiotin	0.010585	3.974818	1.429
	PFPP	2-Methylbutyrylcarnitine	0.010919	-3.943709	0.461
C00180	HILIC	BENZOIC..4.HYDROXYBENZALDEHYDE	0.011300	3.909594	1.306
C00035	HILIC	GDP	0.011457	3.895818	1.674

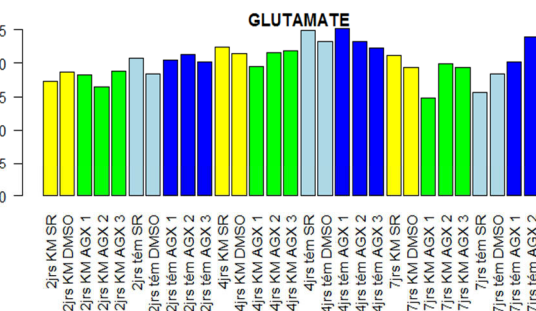
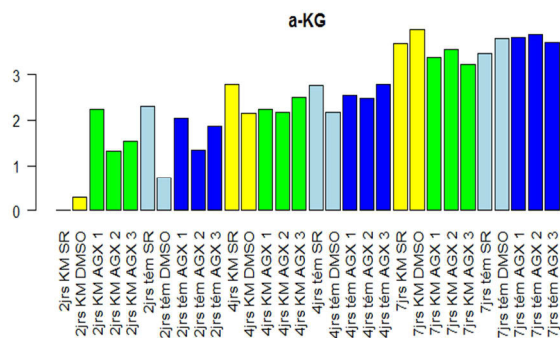
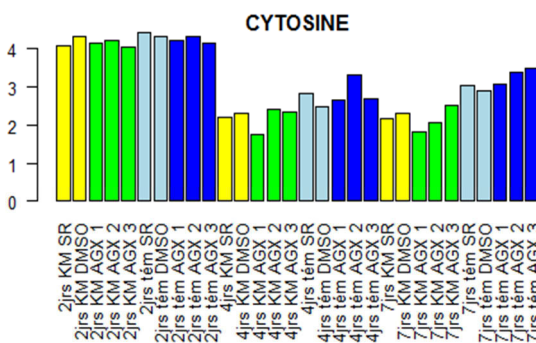
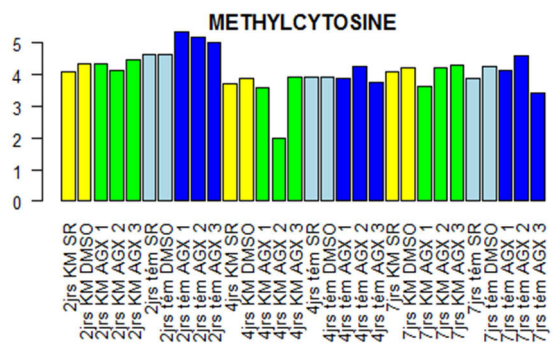
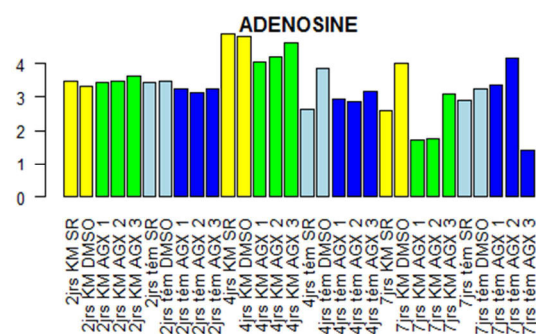
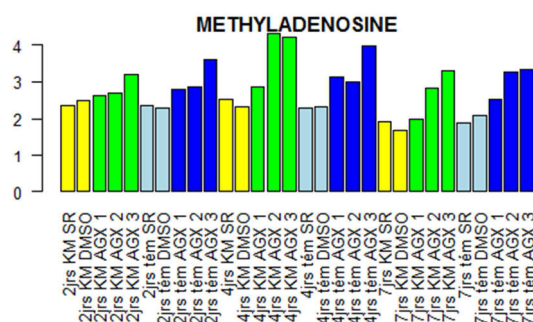
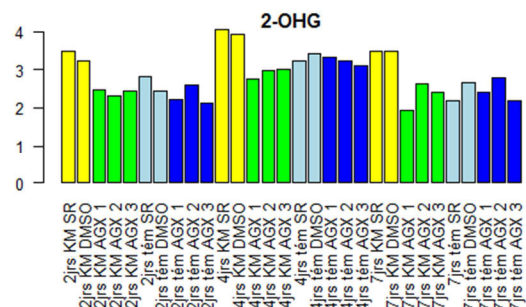
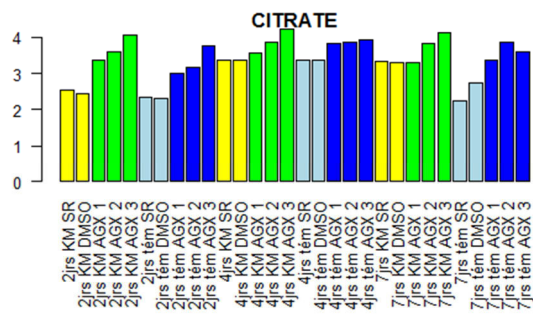
B)

KEGG	Nom officiel retenu	METHODE	P	stat	p.J2	stat.J2	ratio.J2
C02630	X2.Hydroxyglutaric	HILIC	0.000034	-6.169	0.003	-8.690	0.388
C05678	O-Phosphoethanolamine	PFPP	0.001303	-4.079	0.296	-1.261	0.795
C00158	citric	HILIC	0.003421	3.570	0.019	4.589	3.257
C00311	ISOCITRIC	HILIC	0.005391	3.333	0.018	4.709	2.924
C02494	Methyladenosine	PFPP	0.012394	2.901	0.148	1.941	1.558
C02494	METHYLADENOSINE	HILIC	0.017958	2.707	0.187	1.702	1.498
C02630	X2-hydroxyglutaric	GCMS	0.028638	-2.461	0.117	-2.185	0.476
C07574	Tartrazine	PFPP	0.050767	-2.152	0.035	-3.676	0.675
C00570	CDP-ethanolamine	PFPP	0.064145	-2.023	0.045	-3.321	0.801
C00354	D-Fructose1,6-bisphosphate	PFPP	0.100783	1.766	0.246	1.437	1.246
C07086	phenylacetic	HILIC	0.120218	-1.663	0.139	-2.006	0.901
C00158	Citric	GCMS	0.133055	1.602	0.816	0.254	1.105
C00363	dTDP	PFPP	0.136222	-1.588	0.696	-0.431	0.957
C00022	Pyruvic	GCMS	0.144863	-1.551	0.630	0.534	1.142
C00345	6-Phospho-D-gluconate	PFPP	0.147449	1.540	0.662	-0.483	0.906
C07967	Bithionol	PFPP	0.168968	-1.457	0.041	-3.436	0.805

Tableau 4 : Analyses statistiques de l'effet de base du génotype (R140Q versus WT) sur le phénotype (A), et l'effet du traitement sur R140Q (B). J2: « jour 2 », effets à 2 jours considérés isolément.

Alors que nous avons retrouvé un grand nombre de différences liées au génotype, il est important de rappeler que ces anomalies sont *a priori* attribuables aussi bien à l'un ou à l'autre des génotypes, puisque le contrôle est tout de même un patient hospitalier suspect de maladie génétique, bien que n'ayant apparemment pas de maladie métabolique. Ainsi, dans l'attente que des analyses semblables soient réalisées sur d'autres patients, nous avons comparé nos résultats à une étude de lignées cellulaires issues de glioblastomes transfectées par *IDH1 R132H* [Reitman *et al.*, 2011]. Cette étude portait sur 112 métabolites analysés en LC- et GC-MS. Nous n'avons pas retrouvé de corrélation globale sur les 55 métabolites communs entre les deux études, néanmoins il est intéressant de constater que les variations conservées les plus significatives comprennent une augmentation de l'arginine (et dans une moindre mesure, de la serine et de l'asparagine), et une diminution de l'ornithine. Cela pourrait traduire une activité arginase réduite et/ou une surconsommation de l'ornithine (production accrue de polyamines ?) induites par les mutations *IDH*. Des comparaisons sur un nombre de métabolites plus importants et sur des types cellulaires plus proches seront certainement beaucoup plus informatives.

En ce qui concerne l'effet du traitement chez les fibroblastes *IDH2* mutés, nous n'avons retrouvé que très peu de différences significatives (aussi bien en considérant tous les temps de culture qu'à 48H de culture) : deux seuls métabolites étaient significativement diminués par le traitement (2-HG et phosphoéthanolamine) et trois métabolites étaient significativement augmentés (citrate, isocitrate et méthyladénosine) (figure 13). Il est intéressant de remarquer que la phosphoéthanolamine a été impliquée dans le cancer [Ferreira *et al.*, 2013], bien que sa diminution par le traitement ne soit peut-être pas en rapport avec le rôle anti tumoral proposé. Néanmoins, ce résultat suggère une altération dans les voies de synthèse des phospholipides. D'autre part, l'augmentation de la méthyladénosine est également très intéressante mais difficile à interpréter. En effet, il peut s'agir de N1- ou de N6-méthyladénosine (deux formes isobares que nous essayerons de distinguer par des techniques ciblées) et leur augmentation sous inhibiteur pourrait refléter une redistribution des processus de la méthylation. Puisque cela est observé à la fois chez le patient porteur de la mutation *IDH2* et chez le témoin, il n'y a probablement pas de rapport direct avec l'hyperméthylation induite par la mutation *IDH2*. Il est intéressant de remarquer que la méthylation de l'adénosine est une modification post transcriptionnelle fréquente au niveau des ARNm, et elle est antagonisée par une dioxygénase α -KG dépendante (la déméthylase FTO [Jia *et al.*, 2013]), d'une manière semblable à la méthylation de la cytosine au niveau de l'ADN, qui est antagonisée par les enzymes TET. Nous avons également mesuré la 5-méthylcytosine, l'adénosine la cytosine (figure 13), dont les variations sont très dynamiques mais ne semblent que peu ou pas liées au génotype ou au traitement. Nos résultats suggèrent néanmoins que, parmi les processus médiés par les dioxygénases α -KG dépendantes, la (dé)méthylation de l'ARN pourrait être particulièrement sensible au 2-HG, ouvrant une nouvelle piste inexplorée dans l'étude des mécanismes physiopathologiques associés à ce métabolite.



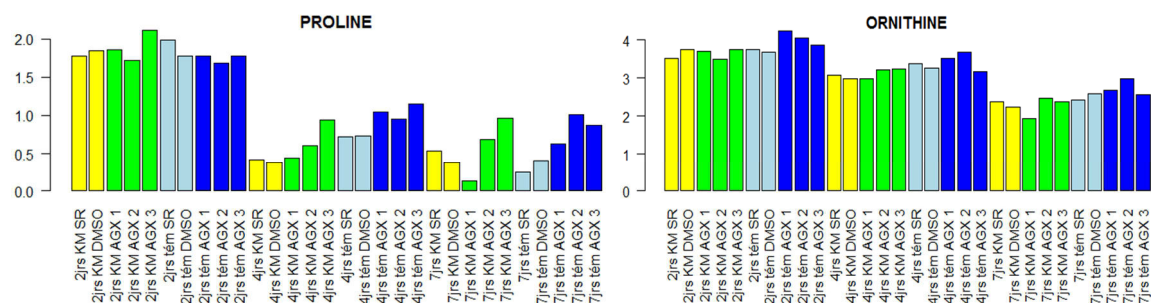


Figure 13 : Effets notoires de l'inhibiteur Agos sur la concentration de certains métabolites..

KM = patient avec acidurie, tém= patient contrôle, 1 et 2 (en jaune et bleu clair) = DMSO et sans rien respectivement et 3, 4 et 5 (vert et bleu foncé) = doses croissantes d'inhibiteur.

Le résultat peut-être le plus surprenant est l'augmentation particulièrement importante du citrate en présence de l'inhibiteur et ceci à la fois chez le patient et le témoin. Notre hypothèse initiale était que le citrate est ensuite utilisé pour la lipogénèse cytoplasmique. Par ailleurs, comme attendu, le taux de 2-HG total est corrigé chez le patient en présence d'inhibiteur.

Ayant mis au point des techniques GC-MS adaptées à l'analyse de flux au sein du laboratoire nous avons souhaité valider ces résultats et chercher à approfondir notre compréhension de l'effet de l'inhibiteur sur les fibroblastes en cultures.

Validation d'hypothèses par l'utilisation de l'analyse de flux

En collaboration avec le Dr. Muriel David à l'IGR et le Dr. Florence Habarou à Necker, nous avons effectué des analyses de flux pour tester ces hypothèses. Nous avons supplémenté le milieu de culture avec des solutions contenant des métabolites marquées aux isotopes stables, principalement au carbone 13. Il s'agissait de glutamine $^{13}\text{C}_5$ pour confirmer l'accumulation du citrate, de palmitate $^{13}\text{C}_{16}$ pour observer le profil des acylcarnitines, et nous avons analysé par coloration des cellules (OilRed) une possible accumulation des gouttelettes lipidiques au sein des cellules sous traitement. Il s'avère que les fibroblastes témoins ou *IDH* mutées traités par AGX présentaient des altérations des acylcarnitines compatibles avec un déficit partiel de l'oxydation des acides gras, avec notamment une baisse de l'acétylcarnitine (reflétant la concentration de l'acétyl-CoA) et du marquage du citrate après charge en palmitate. Néanmoins, les cellules témoins ou mutées ne présentaient pas d'accumulation de lipides (marquage au RedOil (figure 14) et pas de marquage de plusieurs acides gras après charge en glutamine $^{13}\text{C}_5$).

Ainsi, l'inhibiteur AG-221 induirait un déficit partiel de la bêta-oxydation mitochondriale, qui coexisterait paradoxalement avec un déstockage accru de lipides.

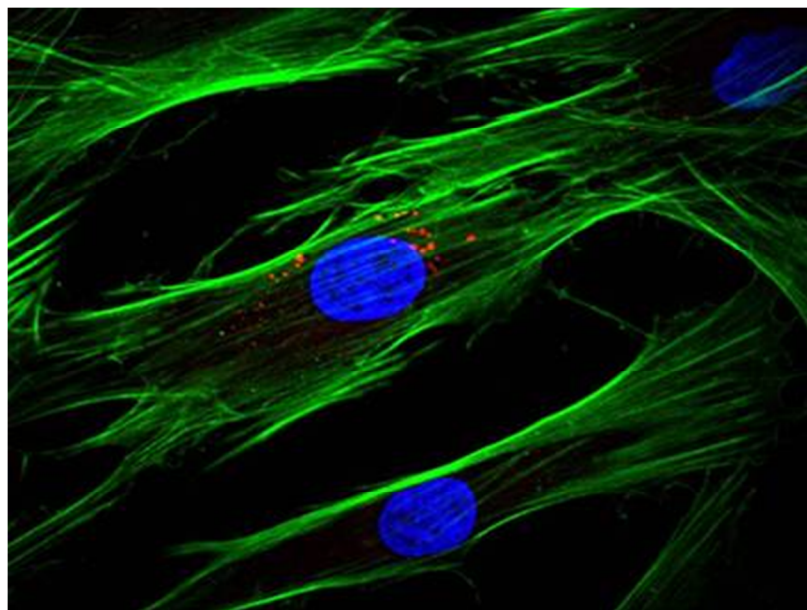


Figure 14 : Visualisation des gouttelettes lipidiques par marquage au RedOil. Gouttelettes visibles en rouge autour du noyau coloré en bleu.

Par ces études de flux, nous avons également observé, via un marquage de la glutamine, une réalimentation du cycle de Krebs en présence d'AGX. Cela suggère que dans les fibroblastes *IDH* mutés, une régulation peut-être compensatoire est à l'œuvre pour alimenter le cycle de Krebs en a-KG en compétition avec son détournement vers la formation de D-2-HG. Si on inhibe la production de 2-HG, la production accrue d'a-KG est ainsi révélée et le cycle de Krebs va être « inondé » de marquage. En effet, le marquage induit par AGX est plus important chez les fibroblastes *IDH* mutés que chez le témoin.

AGX a également un effet inattendu sur les fibroblastes témoins. Tout effet d'AGX sur *IDH* normale est inattendu, car des études enzymatiques *in vitro* par nos collaborateurs n'ont montré aucune inhibition à toutes les concentrations d'inhibiteurs testées [Rohle *et al.*, 2013]. Dans nos études de flux sur fibroblastes, il est clair que AGX augmente la concentration de citrate à la fois en présence de *IDH* normale ou muté, bien que l'augmentation soit plus importante dans le deuxième cas (cf ci-dessus figure 13). Cela est vrai en termes de concentration absolue du citrate et de son marquage à partir de la glutamine ^{13}C . Ceci pourrait révéler une utilisation autre du citrate, ou bien un défaut de transport du citrate en dehors de la mitochondrie (SLC25A1 : transporteur des acides tricarboxyliques), ou finalement un problème lié à la cinétique de marquage des lipides.

2.5 Résumé et conclusion

Les points principaux de cette études furent tout d'abord la validation de l'activité inhibitrice de l'inhibiteur sur les fibroblastes en culture de notre patient. Les effets secondaires de l'inhibiteur, notamment sur la bêta-oxydation des acides gras, et sur la concentration

augmentée de citrate pourraient ouvrir des portes quant à l'explication des mécanismes de tumorigénèse mis en jeu.

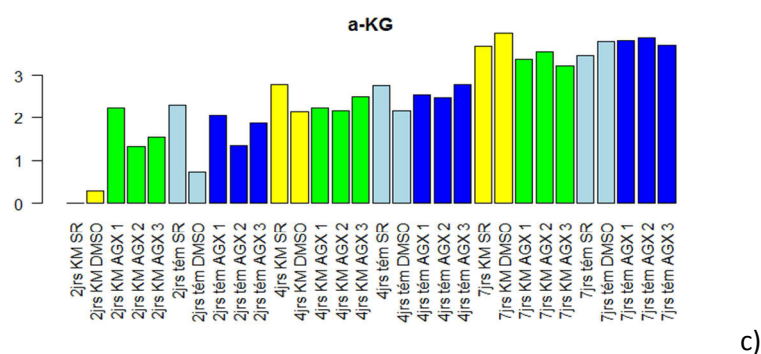
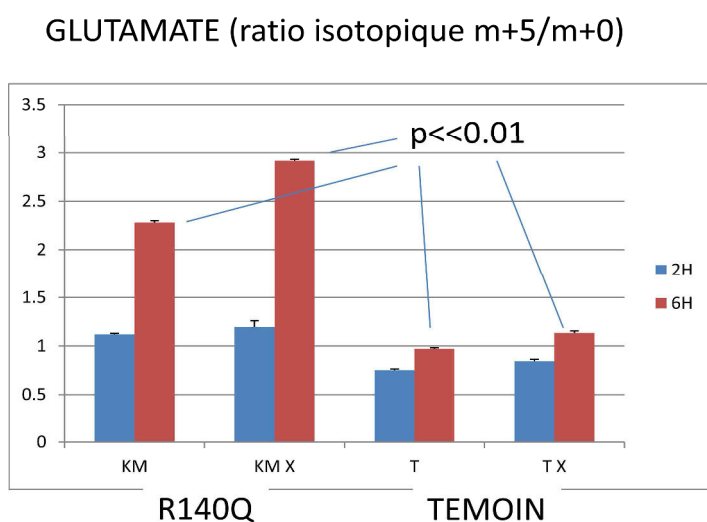
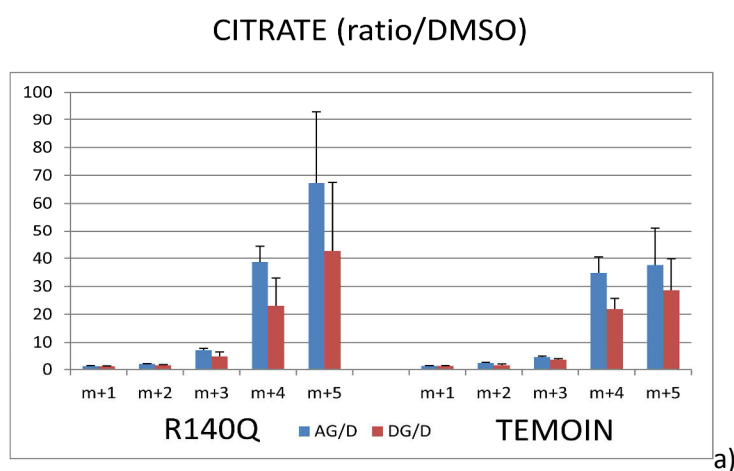


Figure 15 : Etude de l'action de l'inhibiteur sur le flux, par marquage isotopique d'intermédiaire à partir de la glutamine $^{13}\text{C}_5$.

La première figure (a) présente les ratios des ions correspondants au citrate marqué par rapport au naturel, et ce ratio est normalisé par le bruit de fond correspondant au signal du DMSO. La figure b) représente les variations du flux de glutamate, par visualisation du ratio de l'ion moléculaire du composé marqué vs non marqué (naturel). La figure c) remontre le taux d'a-KG en fonction du traitement et des jours d'incubation (cf figure13).

Nous pouvons observer dans la figure ci-dessus, a), un marquage du citrate m+4/+5 (marquage de 4 ou de 5 carbones) plus important chez le patient en présence de l'inhibiteur (en bleu (AG/D)). La figure 15 b) présente les ratios isotopiques du glutamate marqué par la glutamine $^{13}C_5$, et montre une très claire augmentation du flux glutamine vers glutamate chez le patient à 6h, surtout sous inhibiteur (X). Ceci indique que la glutaminase est bien fonctionnelle chez ces deux patients, mais plus chez le patient acidurique *IDH2* mutée, et que ce flux est dirigé vers le D-2-HG sans inhibiteur chez le patient, et vers le Krebs et notamment le citrate en présence d'AG-221. Cet effet de l'inhibiteur est retrouvé pour le citrate et pour le glutamate, suggérant que la glutaminase soit plus active chez le patient possédant la mutation *IDH2* R140Q. L'a-KG qui est un métabolite intermédiaire, semble augmenté à 2 jours de traitement AG-221 (figure c)), chez le patient et le témoin. Nous pensons que cette redistribution du flux n'est pas suffisante pour consommer tout l'a-KG nouvellement produit.

Ci-après, un schéma (figure 16) replace ces métabolites dans les voies biochimiques afin de mieux apprécier les interactions qui les lient :

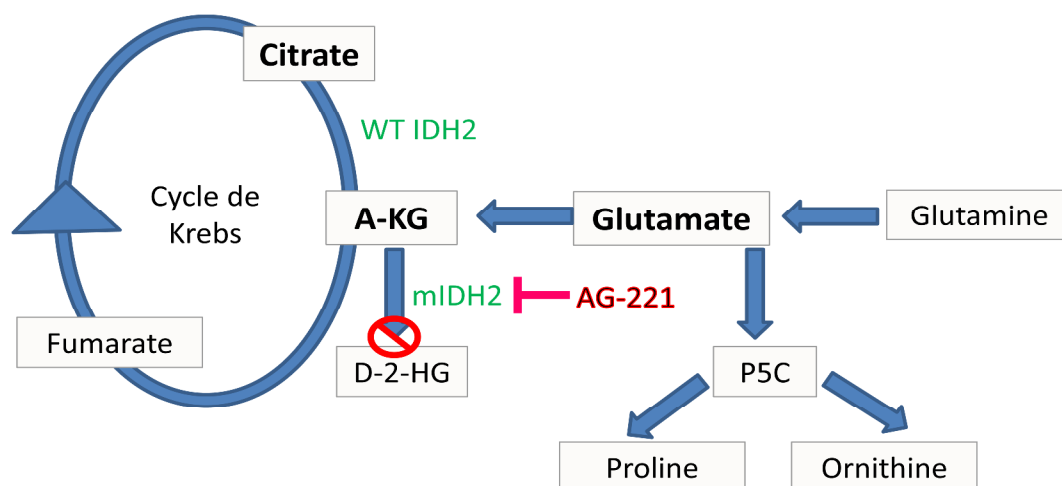


Figure 16 : Réseau métabolique proche de la glutamine et effets d'AG-221.

2.6 Discussion

Nos études cinétiques basées sur l'analyse des cultures primaires de fibroblastes de patients, avec 3 temps d'incubation et 5 conditions permettent d'obtenir des données, certes non exhaustives, sur leur métabolome, mais en relation avec différentes voies reliées au cycle de Krebs.

Il aurait été intéressant de comparer cette lignée cellulaire avec d'autres lignées de fibroblastes possédant des mutations sur *IDH1* par exemple, ou d'inclure plus de lignées contrôles. En effet, la comparaison d'une lignée d'un patient versus une lignée témoin peut révéler des variations qui pourraient être difficilement généralisables.

3. Oncométabolome, méthylome et succinate déshydrogénase

3.1 Contexte et objectifs

Les mutations inactivatrices des gènes de la succinate déshydrogénase (*SDHx*) sont fréquentes dans un certain type de tumeurs neuroendocriniennes, les paragangliomes [Baysal *et al.*, 2000], et sont également à l'origine de phéochromocytomes. Ce déficit au sein du cycle de Krebs n'empêche cependant pas les cellules de survivre, et qui plus est, de continuer une croissance et une prolifération, comme observé dans ces tumeurs. L'accumulation de succinate dans les cellules de ces tumeurs [Burnichon *et al.*, 2010] entraîne un déficit énergétique direct par diminution du FADH₂, et active la voie oncogénique HIF par inhibition des prolyl-hydroxylases HIF [Pollard *et al.*, 2005; Selak *et al.*, 2005].

Le principal objectif de notre étude a été de démontrer les effets des mutations des gènes *SDHx* sur le méthylome des cellules chromaffines de souris, dont la première conséquence de ces mutations est l'accumulation de succinate. Il s'en suit une inactivation de déméthylases d'histones et de l'ADN alpha-cétoglutarate-dépendantes. Le profil d'hyperméthylation résultant entraîne les cellules vers un phénotype distinct qui est rétabli par traitement à la décitabine. Notre étude est donc un très bon exemple des relations entre cycle de Krebs, épigénome et tumorigénèse [Letouzé *et al.*, 2013].

Nous nous sommes également intéressé au dosage du succinate par GC MSMS sur des échantillons de tumeurs humaines, en comparant ce dosage à une approche par RMN, non invasive pour le patient [Lepoutre-Lussey *et al.*, article soumis].

Cette étude a été conduite par le Dr Judith Favier (HEGP, Paris), en collaboration avec le Dr Eric Letouzé et le Dr Charlotte Lepoutre-Lussey [Letouzé *et al.*, 2013]. Ma collaboration a été d'effectuer le dosage du succinate dans les échantillons murins de paragangliomes et dans les tumeurs humaines.

3.2 Matériels et méthodes

Cf. Chapitre 2

3.3 Publications

Letouzé *et al.*, 2013 "SDH mutations establish a hypermethylator phenotype in paraganglioma" Cancer Cell + manuscrit soumis à Nat Cell Biology (coauteurs)

SDH Mutations Establish a Hypermethylator Phenotype in Paraganglioma

Eric Letouzé,^{1,13} Cosimo Martinelli,^{2,3,13} Céline Lorient,^{2,3} Nelly Burnichon,^{2,3,4} Nasséra Abermil,^{3,4} Chris Ottolenghi,^{3,6,7} Maxime Janin,^{6,7} Mélanie Menara,^{2,3} An Thach Nguyen,^{2,3} Paule Benit,⁸ Alexandre Buffet,^{2,3} Charles Marcaillou,⁹ Jérôme Bertherat,^{3,10,11,12} Laurence Amar,^{3,5,12} Pierre Rustin,⁸ Aurélien De Reyniès,¹ Anne-Paule Gimenez-Roqueplo,^{2,3,4,12,14} and Judith Favier^{2,3,14,*}

¹Programme Cartes d'Identité des Tumeurs, Ligue Nationale Contre Le Cancer, 75013 Paris, France

²INSERM, UMR970, Paris-Cardiovascular Research Center (PARCC), 75015 Paris, France

³Faculté de Médecine, Université Paris Descartes, 75006 Paris, France

⁴Service de Génétique

⁵Service d'Hypertension Artérielle

Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Européen Georges Pompidou, 75015 Paris, France

⁶Service de Biochimie Métabolique, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker-Enfants Malades, 75015 Paris, France

⁷INSERM U747, 75015 Paris, France

⁸INSERM U676, Hôpital Robert Debré, 75019 Paris, France

⁹IntegraGen, 91030 Evry, France

¹⁰Service des Maladies Endocriniennes et Métaboliques, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Cochin, Centre de Référence Maladies Rares de la Surrénale, 75014 Paris, France

¹¹INSERM U1016, Institut Cochin, 75014 Paris, France

¹²Rare Adrenal Cancer Network-Cortico Médullosurrénale Tumeur Endocrine, Institut National du Cancer, 75014 Paris, France

¹³These authors contributed equally to this work

¹⁴These authors contributed equally to this work

*Correspondence: judith.favier@inserm.fr
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2013.04.018>

SUMMARY

Paragangliomas are neuroendocrine tumors frequently associated with mutations in *RET*, *NF1*, *VHL*, and succinate dehydrogenase (*SDHx*) genes. Methylome analysis of a large paraganglioma cohort identified three stable clusters, associated with distinct clinical features and mutational status. *SDHx*-related tumors displayed a hypermethylator phenotype, associated with downregulation of key genes involved in neuroendocrine differentiation. Succinate accumulation in *SDH*-deficient mouse chromaffin cells led to DNA hypermethylation by inhibition of 2-OG-dependent histone and DNA demethylases and established a migratory phenotype reversed by decitabine treatment. Epigenetic silencing was particularly severe in *SDHB*-mutated tumors, potentially explaining their malignancy. Finally, inactivating *FH* mutations were identified in the only hypermethylated tumor without *SDHx* mutations. These findings emphasize the interplay between the Krebs cycle, epigenomic changes, and cancer.

INTRODUCTION

Paragangliomas (PGL) are neural crest-derived tumors that arise from parasympathetic ganglia of the head and neck region or

from sympathetic ganglia located in the thorax, abdomen, or pelvis. These tumors may develop in the adrenal medulla, in which case they are called pheochromocytomas (PCC) (Lenders et al., 2005). There has been extensive genetic characterization

Significance

Unexpected links between epigenetic and genetic alterations were recently identified with the demonstration that *IDH* mutations impair DNA demethylation in gliomas. Mutations affecting succinate dehydrogenase (*SDH*), another tricarboxylic acid cycle enzyme, have been identified in several cancers and are particularly frequent in paragangliomas. With this genome-wide analysis of DNA methylation changes in a large paraganglioma cohort, we demonstrate that *SDHx*, and particularly *SDHB*-related metastatic tumors, display a hypermethylator phenotype, associated with downregulation of key genes implicated in chromaffin cell differentiation. These findings explain the oncogenic effect of *SDH* inactivation and the invasiveness of *SDHB*-mutated tumors and raise the possibility of innovative epigenetic therapies involving DNA demethylating agents for these cancers.

of PGL/PCC. At least 30% of patients harbor a germline mutation in one of the ten identified susceptibility genes (Gimenez-Roqueplo et al., 2012): *RET*, *NF1*, *VHL*, *SDHAF2*, *TMEM127*, or *MAX*, and in genes encoding the four subunits of succinate dehydrogenase (*SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, or *SDHD*, referred to as *SDHx* genes). Integrated genomic analysis of the largest available cohort of PGL/PCC, recruited by the French COMETE network, identified homogeneous molecular subgroups associated with susceptibility genes (Burnichon et al., 2011) and showed that a large proportion of sporadic PGL/PCC carry a somatic mutation in *VHL*, *RET*, *NF1*, *MAX*, or *HIF2A* genes (Burnichon et al., 2011, 2012a, 2012b; Favier et al., 2012). Overall, 60% of cases harbor a somatic or germline mutation in a known predisposing gene.

Various important issues remain to be unraveled, including the oncogenic role of *SDHx* mutations. Succinate dehydrogenase was the first mitochondrial enzyme to be identified as a tumor suppressor in familial PGL (Baysal et al., 2000). Its inactivation also predisposes to renal cell carcinoma (Ricketts et al., 2008) and gastrointestinal stromal tumors (Janeway et al., 2011). To date, the only mechanism linking SDH to cancer involves hypoxia-inducible factors (HIFs) (Dahia et al., 2005; Gimenez-Roqueplo et al., 2001). SDH dysfunction results in the accumulation of succinate (Pollard et al., 2005), its tricarboxylic acid cycle (TCA) substrate, which acts as a competitive inhibitor of the 2-oxoglutarate (2-OG)-dependent HIF prolyl-hydroxylases (Brière et al., 2005; Selak et al., 2005). This stabilizes HIF- α and activates genes that facilitate angiogenesis and anaerobic metabolism. However, the exact role of HIFs in oncogenesis remains unclear (Young and Simon, 2012). Understanding SDH-related tumorigenesis is crucial, because the presence of a germline mutation in the *SDHB* gene is a major risk factor of malignancy and of poor prognosis. Around 40% of all patients with a metastatic form of the disease harbor an *SDHB* mutation (Pasini and Stratakis, 2009). *SDHB*-mutation carriers have a 19-fold higher risk of developing a metastatic disease (Gimenez-Roqueplo et al., 2003) and shorter survival than patients with a malignant PGL/PCC but without *SDHB* mutations (Amar et al., 2007).

DNA methylation changes are hallmarks of human cancers (Hanahan and Weinberg, 2011). Cancer cells often display overall DNA hypomethylation and hypermethylation of promoter CpG islands, resulting in the transcriptional silencing of tumor suppressor genes (Jones and Baylin, 2007). Unlike genetic mutations, DNA methylation is a reversible process and is thus a promising target for drug development (Rodríguez-Paredes and Esteller, 2011). These epigenetic features are also useful as biomarkers for early detection of cancer in blood samples, for prognosis, or for prediction of response to treatment (Laird, 2003). Genome-scale DNA methylation profiling has allowed the identification of epigenetic subtypes in several cancers (Hinoue et al., 2012; Noushmehr et al., 2010). A CpG island methylator phenotype (CIMP), characterized by the concerted hypermethylation of a large number of genes, was initially described in colorectal cancer (Toyota et al., 1999) and was recently identified in glioma (G-CIMP; Noushmehr et al., 2010). In glioma, the G-CIMP phenotype is associated with gain-of-function mutations in *IDH1* and *IDH2* that confer to these enzymes a neomorphic capacity to convert α -ketoglutarate (α -KG, or 2-OG) into the oncometabolite 2-hydroxyglutarate (2-HG). 2-HG acts as a

competitive inhibitor of 2-OG-dependent dioxygenases, including histone demethylases and the TET family of 5-methylcytosine (5-mC) hydroxylases, leading to genome-wide DNA methylation alterations (Xu et al., 2011). Succinate also can inhibit these enzymes in vitro, suggesting that SDH-related tumorigenesis may involve epigenetic alterations (Xiao et al., 2012). However, DNA methylation changes of only a limited number of genes have been investigated so far in PGL/PCC (Geli et al., 2008) and have not been compared with expression data or mutational status.

Here, we report the genome-scale methylome and transcriptome profiling of the well-annotated COMETE cohort and investigate the relationship between *SDHx* mutations and DNA methylation changes in a mouse model of SDH-related paraganglioma.

RESULTS

DNA Methylation-Based Classification of Pheochromocytomas and Paragangliomas

We determined DNA methylation profiles of 145 pheochromocytomas and paragangliomas using the Illumina Infinium HM27 DNA methylation assay, which assesses the degree of methylation of 27,578 CpG sites in promoter regions of 14,495 protein-coding genes (Bibikova et al., 2009). Gene expression was previously characterized in most of these samples (Burnichon et al., 2011), and the mutation status of the main genes predisposing to PGL/PCC (*SDHx*, *VHL*, *NF1*, *RET*, *TMEM127*, and *MAX*) was analyzed (Table S1 available online). As previously described (Hinoue et al., 2012), we excluded probes that might be unreliable and probes designed for sequences on sex chromosomes. We selected the 10% most variant probes, according to the standard deviation of the beta values, and performed consensus clustering (Monti et al., 2003) to identify DNA methylation clusters. The optimal classification defined three tumor subgroups (Figure 1A; Figure S1). Tumors of the M1 cluster displayed concerted hypermethylation at a large number of loci (Figure 1B), reminiscent of the CpG island methylator phenotypes described in colorectal cancer and glioblastoma.

For comparison, we applied a second clustering approach, the recursively partitioned mixture model (RPMM; Houseman et al., 2008), to our data set. Cluster assignments using consensus clustering and RPMM were strongly correlated ($p = 9.7 \times 10^{-39}$), with the two methods agreeing on cluster membership for 90% (130/145) of the tumors (Figure S1F). In particular, the M1 cluster was similarly identified by the RPMM approach, with only 1/17 samples misclassified. We based our subsequent analyses on the consensus clusters, which showed better association with clinical criteria.

We next sought to characterize DNA methylation changes in each cluster. We analyzed probes located within and outside CpG islands separately (Takai and Jones, 2002). Most CpGs within CpG islands are demethylated in normal tissues and undergo hypermethylation in tumors (Jones and Baylin, 2007), whereas CpGs outside CpG islands are mostly highly methylated in normal tissues and undergo loss of DNA methylation in cancers (Feinberg and Vogelstein, 1983). Because of the difficulty in obtaining samples of normal adrenal medulla, only three normal controls were available, hence the comparison with tumor clusters had limited power. After FDR adjustment,

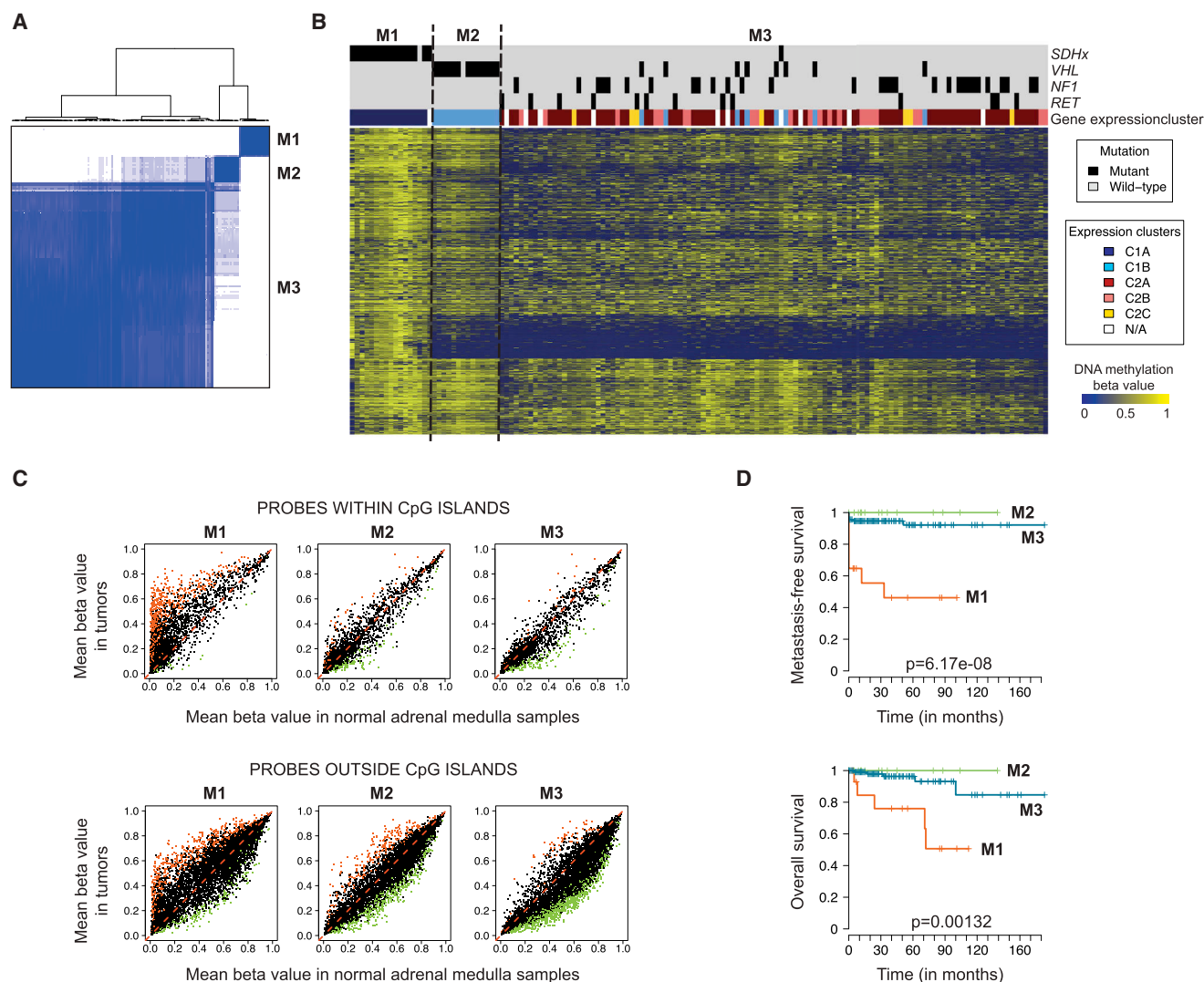


Figure 1. Genome-wide DNA Methylation Profiling of PGL/PCC Identifies a Hypermethylator Phenotype Associated with *SDHx* Mutations

(A) Unsupervised classification of 145 PGL/PCC samples (see Table S1) identifies three stable DNA methylation clusters. The consensus matrix represents the similarity between tumors. Consensus index values range from zero (highly dissimilar profiles, white) to one (highly similar profiles, dark blue). Samples are ordered on the x and y axes by the consensus clustering, which is depicted atop the heatmap. See also Figure S1.

(B) Heatmap representation of DNA methylation profiles. The degree of DNA methylation (beta value) for each probe (row) in each sample (column) is represented by a color scale (dark blue, nonmethylated; yellow, methylated). Tumor samples are ordered by methylation cluster. Probes are arranged by similarity, as assessed by hierarchical cluster analysis. The mutation status of the main genes predisposing to PGL/PCC (*SDHx*, *VHL*, *NF1*, and *RET*) is indicated above the heatmap, together with expression cluster memberships as determined in a previous study (Burnichon et al., 2011).

(C) Scatterplots comparing methylation levels between tumor subgroups and normal adrenal medulla controls are shown for probes located within (top) or outside (bottom) CpG islands (Takai-Jones definition [Takai and Jones, 2002]). Probes significantly hyper- or hypomethylated in tumors ($p < 0.01$) are indicated in red and green, respectively. See also Table S2.

(D) Kaplan-Meier curves for metastasis-free survival and overall survival.

significant methylation differences between tumors and normal controls were only detected in cluster M1 (1,015 probes with FDR-adjusted $p < 0.05$). However, the number of significant tests ($p < 0.01$) was substantially higher than expected by chance in each cluster (8.7%, 4.8%, and 6.4% in M1, M2, and M3, respectively). Cluster M1 tumors displayed a hypermethylation phenotype, characterized by high methylation levels at a large number of CpG sites, both within (7.2% of probes, $p < 0.01$; Figure 1C; Table S2) and outside (7.0%) CpG islands. Clusters M2 and

M3 did not display substantial hypermethylation within CpG islands, but a strong hypomethylation outside CpG islands was observed in both clusters, particularly in cluster M3 (5.9% of probes hypomethylated in M2, 9.6% in M3).

Association with Genomic and Clinical Features

DNA methylation clusters were highly associated with mutational status ($p = 3.3 \times 10^{-33}$) and gene expression clusters ($p = 1.3 \times 10^{-41}$) (Figure 1B; Table 1). In particular, the hypermethylation

Table 1. Clinical and Genomic Characteristics of DNA Methylation Consensus Clusters

	Overall (n = 145)	Cluster M1 (n = 17)	Cluster M2 (n = 14)	Cluster M3 (n = 114)	p Value
Gender					
Female	93 (64%)	11 (65%)	6 (43%)	76 (67%)	0.22
Male	52 (36%)	6 (35%)	8 (57%)	38 (33%)	
Age					
Median	44	32	25.5	47	1.80×10^{-7}
Range	7–82	10–63	10–49	7–82	
Histology ^a					
Paranglioma	15 (10%)	9 (56%)	1 (7%)	5 (4%)	1.51×10^{-9}
Pheochromocytoma	129 (90%)	7 (44%)	13 (93%)	109 (96%)	
Mutational Status					
<i>SDHx</i>	17 (12%)	16 (94%)	0	1 (1%)	3.32×10^{-33}
<i>VHL</i>	21 (14%)	0	13 (93%)	8 (7%)	
<i>NF1</i>	30 (21%)	0	0	30 (26%)	
<i>RET</i>	13 (9%)	0	0	13 (11%)	
Other	64 (44%)	1 (6%)	1 (7%)	62 (54%)	
Expression Cluster ^a					
C1A	16 (12%)	16 (100%)	0	0	1.33×10^{-41}
C1B	22 (16%)	0	14 (100%)	8 (8%)	
C2A	67 (50%)	0	0	67 (64%)	
C2B	22 (16%)	0	0	22 (21%)	
C2C	7 (5%)	0	0	7 (7%)	

Clinical and genomic features are indicated for each DNA methylation cluster, in absolute numbers and as a percentage of each group size. p values are obtained by chi-square tests for qualitative variables and ANOVA for age.

^aHistology could not be determined for one patient with both abdominal paraganglioma and adrenal pheochromocytoma at first presentation. Gene expression data were available for 134 samples.

phenotype was strongly associated with *SDHx* mutations. In cluster M1, 16/17 tumors were SDH-related (1 *SDHA*, 11 *SDHB*, 1 *SDHC*, and 3 *SDHD* germline mutations), and one was sporadic. Cluster M2 included 13/21 *VHL*-related tumors and one sporadic tumor. All *RET* and *NF1*-related samples were members of cluster M3, together with the remaining sporadic and *VHL*-mutated samples. Clusters M1 and M2 corresponded to the previously described C1A (*SDHx*-related) and C1B (*VHL*-related) expression clusters (Burnichon et al., 2011), and the M3 cluster comprised all tumors of the C2 (*RET/NF1*-related) expression cluster, plus eight tumors from the C1B group. Age at diagnosis and histology, which are known to be associated with mutational status (Amar et al., 2005; Neumann et al., 2002), differed significantly between DNA methylation clusters ($p = 1.8 \times 10^{-7}$ and $p = 1.5 \times 10^{-9}$, respectively). The median age at diagnosis was younger for clusters M1 (32 years) and M2 (25.5 years) than for cluster M3 (47 years), and cluster M1 was enriched in paragangliomas (56% versus $\leq 7\%$ in clusters M2 and M3). Note that only SDH-related paragangliomas displayed a hypermethylator phenotype. Hypermethylation is thus specifically associated with *SDHx* mutations, rather than a characteristic of extra-adrenal tumors. Methylation clusters were significantly associated with both metastasis-free survival (MFS, $p = 6.2 \times 10^{-8}$) and overall survival (OS, $p = 0.0013$), with the prognosis being much worse for M1 tumors than M2 and M3 tumors (Figure 1D). However, the presence of an *SDHB* mutation predicted prognosis more significantly than

methylation cluster membership in our series ($p = 8.9 \times 10^{-10}$ and $p = 8.2 \times 10^{-6}$ for MFS and OS, respectively).

Sdhb Knockout in Mouse Chromaffin Cells Establishes a Hypermethylator Phenotype and Promotes Cell Migration

To investigate the mechanisms linking SDH deficiency with methylation, we generated an immortalized mouse chromaffin cell (imCC) line harboring a complete defect in SDH. We created genetically modified mice in which the endogenous *Sdhb* exon 2 is flanked by LoxP sites, isolated chromaffin cells from their adrenal medulla, and deleted *Sdhb* by Cre-mediated recombination (Figure 2A). Suppression of exon 2 leads to a premature stop codon and to the predicted translation of a truncated 33 amino-acids protein, instead of the 283 amino-acids wild-type (WT) SDHB protein. Two independent *Sdhb*^{−/−} clones were studied (c6 and c8). As previously reported for human tumors (Favie et al., 2009; van Nederveen et al., 2009), *Sdhb*-deficient cells completely lost SDHB protein production but had normal SDHA levels (Figure S2A). They displayed a selective loss of SDH/succinate cytochrome c reductase (SCCR) activity (Figures 2B, S2B, and S2C), accompanied by large increases in both intracellular (Figure 2C) and secreted (Figure S2D) succinate levels and abnormally small amounts of the following organic acids (fumarate and malate) produced by the TCA cycle. Expression and nuclear translocation of HIF2 α were also higher than in controls (Figures S2E).

We used reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) (Meissner et al., 2005) to examine base-pair resolution DNA methylation patterns in two samples of WT cells and in both *Sdhb*^{−/−} clones. We obtained more than 15 million high-quality aligned reads per sample, yielding quantitative DNA methylation data for 1,530,785 CpG dinucleotides (coverage ≥ 10 reads in each sample). Hierarchical clustering identified two clusters corresponding to WT and *Sdhb*^{−/−} cells (Figure 2D). Like SDH-related tumors, *Sdhb*-deficient cells displayed a widespread hypermethylation both within and outside CpG islands (Figure 2E). We obtained DNA methylation rates with more than ten individual CpG measurements for 78% of CpG islands ($n = 12,503$). CpG island methylation rates were highly correlated between the two WT samples and between the two *Sdhb*^{−/−} clones (Figure S2F). By contrast, 3,357 CpG islands were significantly hypermethylated, and 242 were significantly hypomethylated in *Sdhb*^{−/−} clones as compared to WT cells (FDR-adjusted $p < 0.05$ and absolute methylation difference $> 5\%$) (Figure S2G). Genes hypermethylated in *Sdhb*-deficient imCCs significantly overlapped those hypermethylated in SDH-related PGL/PCC ($p = 3.2 \times 10^{-170}$), with 1,014 genes in common (Figure 2F; Table S3).

Although SDH-deficiency led to a mean 2-fold decrease in growth rate (Figure S2H), *Sdhb*^{−/−} cells had marked increased migration capacities as assessed in a wound healing scratch assay (Figure 2G). These characteristics are consistent with the known specificities of *SDHB*-related PGL/PCC, which are not associated with increased proliferation but are associated with invasiveness. To investigate the role of DNA methylation in this phenotype, we treated *Sdhb*^{−/−} cells for 72hr with low (10 nM) or higher (5 μ M) doses of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine or DAC), an epigenetic modifier that inhibits DNA methyltransferase activity. High doses induced cytotoxicity in all cell types (from 10% to 25% of cell death after 3 days), which was markedly reduced at low doses (cell death $< 8\%$). After drug withdrawal, the effect of DAC was assessed on cell proliferation and migration. We observed a dose-dependant blockade of cell growth in both WT and *Sdhb*^{−/−} cells (Figure S2H). In contrast, an inhibition of collective cell migration was specifically observed in SDH-deficient cells, but not in WT cells (Figure 2H).

SDH-Deficient Chromaffin Cells Display Increased 5-mC/5-hmC Ratio and Histone Methylation

Tet-mediated conversion of 5-mC to 5-hmC was evaluated by flow cytometry and immunofluorescence analyses: there was more 5-mC in *Sdhb*^{−/−} than the WT imCCs (Figures 3A and 3B). This effect was reversed by the addition of 2-OG to the culture medium, which also led to an increase in 5-hmC staining of *Sdhb*^{−/−} cells (Figure S3A). The methylation of lysines 9 and 27 of histone 3 was then assessed by western blotting. Loss of *Sdhb* increased H3K9me3, H3K27me2, and H3K27me3 levels (Figure 3C, quantified in Figure S3B). As both H3K9 and H3K27 methylation are closely linked with DNA methylation (Cedar and Bergman, 2009), these effects on histone methylation may contribute to the establishment of the hypermethylator phenotype.

To confirm the inhibition of oxidative demethylation by succinate in human PGL/PCC, we first measured succinate and fumarate concentrations in a subset of tumor samples and confirmed

a mean 100-fold increase in succinate levels in *SDHx*- versus non-*SDHx*-mutated PGL/PCC (Table S4). We next used immunohistochemistry to quantify 5-mC and 5-hmC, as well as H3K9me3 and H3K27me3, in 39 paraffin-embedded tumor samples with various genetic backgrounds. All (16/16) *SDHx*-mutated tumors had low 5-hmC levels, whereas 70% (16/23) of non-SDH samples had high levels of 5-hmC (Figure 3D; Table S5). Similarly, 81% of SDH-related PGL/PCC displayed abundant H3K27me3, whereas 43% of non-SDH tumors displayed low H3K27me3 levels (Figure 3E; Table S5). Succinate inhibition of oxidative demethylation by TET proteins and Jumonji domain-containing histone demethylases may thus be the mechanism responsible for the accumulation of DNA methylation in SDH-deficient tumors.

Transcriptional Changes Associated with the Hypermethylator Phenotype

To better understand the impact of DNA hypermethylation in tumors of the M1 cluster, we examined the relationship between methylation and expression changes in these tumors. Principal component analysis indicated that the transcriptome differed between the DNA methylation subgroups (Figure 4A), consistent with the strong association between methylation and expression clusters. Of the 7,136 CpG sites that were differently methylated in M1 and non-M1 tumors (FDR-adjusted $p < 0.05$), 6,850 (96%) were hypermethylated in M1 tumors, resulting in a highly asymmetric volcano plot (Figure 4B). The transcriptome data, available for 134/145 samples, revealed a similar asymmetry (Figure 4C), with 623 genes significantly downregulated (FDR-adjusted $p < 0.05$) and 356 genes significantly upregulated in cluster M1 (Table S6). Integrated transcriptome and methylome analysis revealed that 11.5% of genes with significant hypermethylation in M1 tumors (FDR-adjusted $p < 0.05$ and beta value difference > 0.1) also showed more than a 2-fold reduction in gene expression and that the mean shift in expression values correlated with the amplitude of the methylation difference (Figure 4D). To gain a more comprehensive view of DNA methylation changes in M1 tumors, we reanalyzed 22 tumors (ten M1, two M2, and ten M3) using the Illumina Infinium 450K assay, which assesses the methylation levels of more than 485,000 CpG sites. Using probes present on both the 27K and 450K arrays, we verified that the beta value differences between M1 and non-M1 tumors were consistent in the two data sets (mean absolute difference = 0.023). Overall, we identified 4,663 genes with significant hypermethylation of their promoter CpG islands (Table S7). The overlap between the lists of hypermethylated and downregulated genes was highly significant ($p = 1.5 \times 10^{-7}$), with 191 genes showing both significant CpG island hypermethylation and significant downregulation in M1 tumors (Table S8). Gene ontology analysis of this set of genes showed a significant enrichment in terms associated with neuroendocrine differentiation (Table S9). Several genes are associated with catecholamine metabolic process [*PNMT* (Figure S4), *DRD2*, and *SULT1A1*], transport (*SLC6A2*), or secretion (*NPY*); *RET* and *NRP2* are implicated in the differentiation of neural-crest cells. *RBP1* is a tumor suppressor known to be epigenetically silenced in several cancers (Esteller et al., 2002). Downregulation of *SPOCK2*, an inhibitor of matrix-metalloproteases, of *KRT19* (Figure S4), a key marker of the epithelial-to-mesenchymal transition

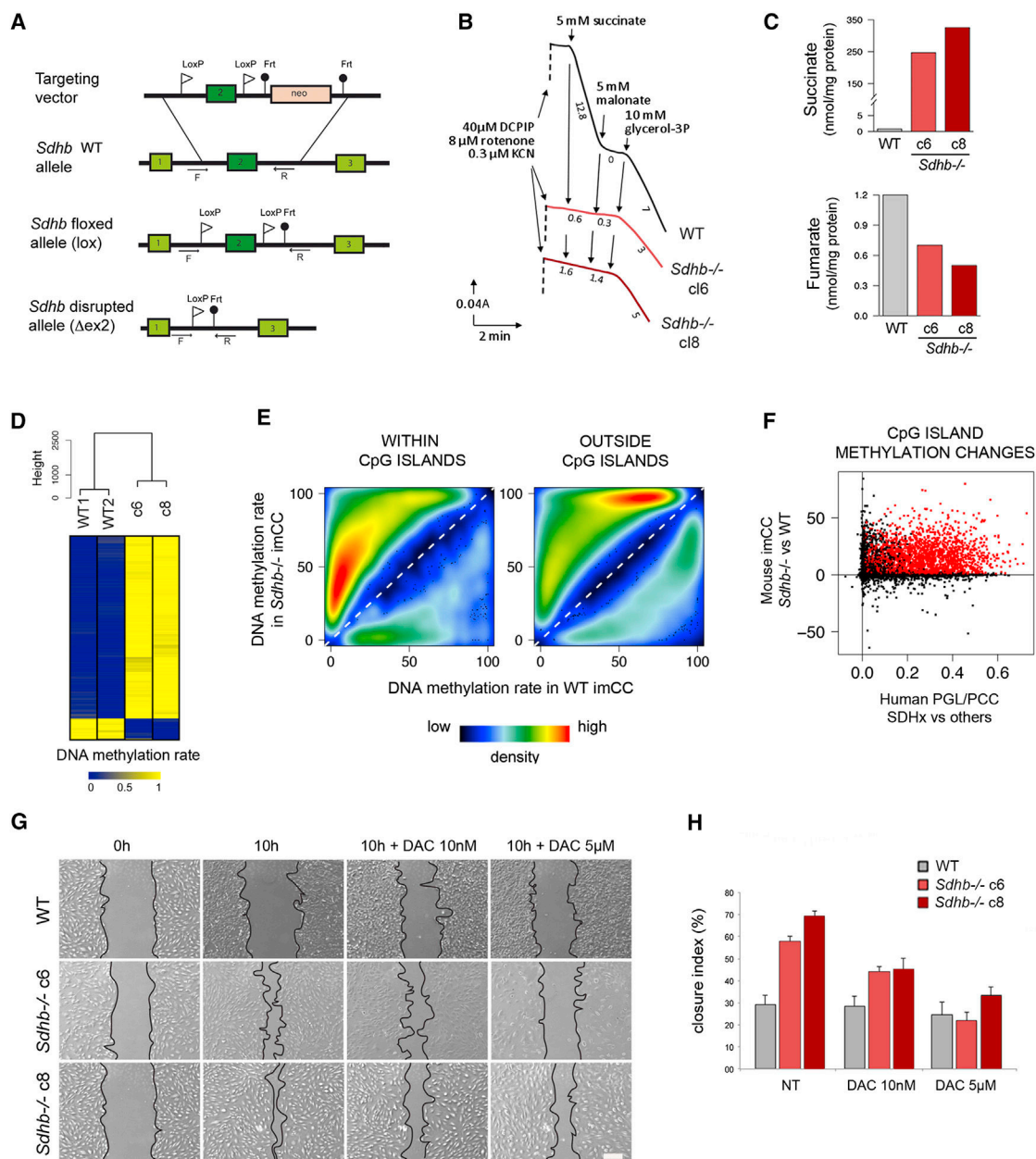


Figure 2. Generation and Characterization of *Sdhb*-Deficient Mouse Chromaffin Cells

(A) Strategy used for the generation of *Sdhb* knockout in mouse. The targeting vector comprises mouse *Sdhb* exon 2 locus flanked with LoxP sites and followed by a Neomycin (neo) resistance cassette flanked with Frt sites, which is removed after Flip-mediated recombination between the Frt sites. Primers for genotyping (arrows) are indicated below their target sequences.

(B) SDH activity in WT cells (black) measured by 2,6-dichlorophenol-indophenol reduction (in the presence of rotenone, inhibitor of complex I, and cyanide, inhibitor of complex IV) is triggered by succinate addition and subsequently inhibited by adding malonate, a specific SDH inhibitor. The subsequent addition of glycerol-3P triggers the activity of the mitochondrial glycerol-3P dehydrogenase in the same sample. Similar assays were carried out on *Sdhb*^{-/-} c6 (light red) and c8 (dark red) imCCs. Numbers along the traces are nmol/min per mg protein.

(C) Gas chromatography-mass spectrometry analysis of organic acids revealing a substantial accumulation of succinate and the depletion of fumarate in *Sdhb*^{-/-} cells relative to controls.

(D) Hierarchical clustering analysis of DNA methylation profiles from four mouse chromaffin cell samples, with (c6 and c8 clones) or without (WT1 and WT2) a knockout of *Sdhb* gene, analyzed by reduced representation bisulfite sequencing (RRBS). A heatmap indicates the degree of methylation of the 500 most variant CpG sites in each sample (dark blue, nonmethylated; yellow, methylated).

(E) Smoothed color density representation of the scatterplots representing DNA methylation changes between WT and *Sdhb*^{-/-} imCCs, within (left) and outside (right) CpG islands. Only CpG sites showing significantly different methylation rates between WT and *Sdhb*^{-/-} cells are represented.

(F) Comparison of DNA methylation changes in SDH-related human PGL/PCC and *Sdhb*^{-/-} imCCs. CpG island methylation rates were calculated for all mouse/human gene homologs represented in Illumina methylation arrays and RRBS data. Each point represents a gene, with the CpG island methylation difference (legend continued on next page)

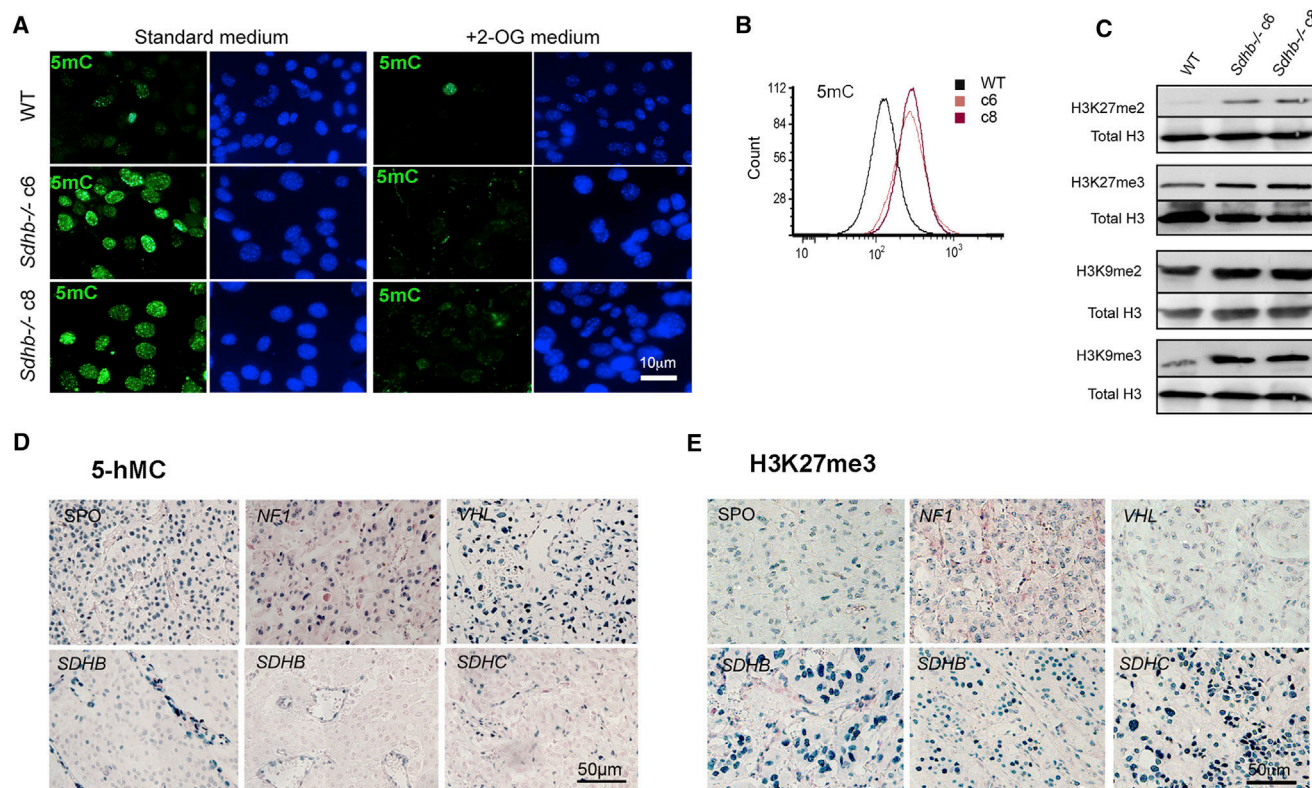


Figure 3. Functional Consequences of SDH Inactivation on Oxidative Demethylation

(A) Immunofluorescence showing a larger number of 5-mC-positive nuclei in *Sdhb*^{-/-} clones. Addition of 2-OG to the culture medium reversed this phenotype. Scale bar = 10 μm.

(B) Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis also showed that *Sdhb* knockout leads to an increase in 5-mC in imCCs.

(C) Histone lysine methylation levels were assessed by western blotting with specific antibodies. Total H3 was used as a loading control.

(D) 5-hmC levels were studied on human PGL/PCC with various genetic backgrounds. Strong immunostaining of endothelial cell nuclei was observed in all tumor types, whereas the tumor cell staining was weaker in *SDHx*-mutated tumors. Scale bar = 50 μm.

(E) H3K27me3 levels are shown for tumors with various genetic backgrounds. Scale bar: 100 μm; SPO: sporadic tumor. See also Figure S3 and Tables S4 and S5. Scale bar = 50 μm.

(EMT) and of *DNAJA4*, recently shown to be a metastasis suppressor gene (Pencheva et al., 2012), may participate to the invasive phenotype of SDH-deficient cells. These findings indicate that methylome remodeling results in major transcriptional abnormalities in SDH-related tumors, directly associated with their phenotypic characteristics.

Exome Sequencing of the Only Hypermethylated Sample without *SDHx* Mutation Identified Inactivating Mutations in the *FH* Gene

A single tumor in our data set (HS_121) carried no *SDHx* mutation but displayed a hypermethylator phenotype (Figure 1B) as well as both low 5-hmC and high H3K9 and H3K27 methylation (Table S5). This tumor, which also belonged to the C1A (*SDH*-related) expression cluster was a local recurrence of an adrenal pheo-

chromocytoma resected from a 63-year-old female presenting a high level of urinary normetanephrines. To explain this “SDH-like” phenotype, we performed the whole-exome sequencing of tumor and matched blood DNA. We identified 21 nonsynonymous somatic mutations effecting exons or splice sites in this tumor, 16 of which were predicted to have functional consequences (Table S10). In particular, a somatic mutation was identified in exon 7 of the *fumarate hydratase* (*FH*) gene (c.1043G > C, p.Gly348Ala). This patient also carried a germline mutation in exon 3 of *FH* (c.349G > C, p.Ala117Pro). Both mutations were verified by Sanger sequencing (Figure 5A). The p.Ala117Pro mutation has been described previously in patients with multiple leiomyomatosis and/or renal cancer, displaying reduced *FH* activity. Interestingly, the patient’s clinical record revealed that she had benefited from a total hysterectomy at 35 years old for

between *Sdhb*^{-/-} and WT imCCs along the y axis and the CpG island methylation difference between *SDHx*-related PGL/PCC and other tumors along the x axis. Genes significantly hypermethylated in both human tumors and mouse chromaffin cells are indicated in red.

(G) Cell migration is shown in a wound scratch assay after 10 hr, in standard medium or following 72 hr of DAC treatment at 10 nM or 5 μM. Scale bar = 100 μm.

(H) Reversion of the migratory phenotype by decitabine treatment. Data are mean ± SEM.

See also Figure S2 and Table S3.

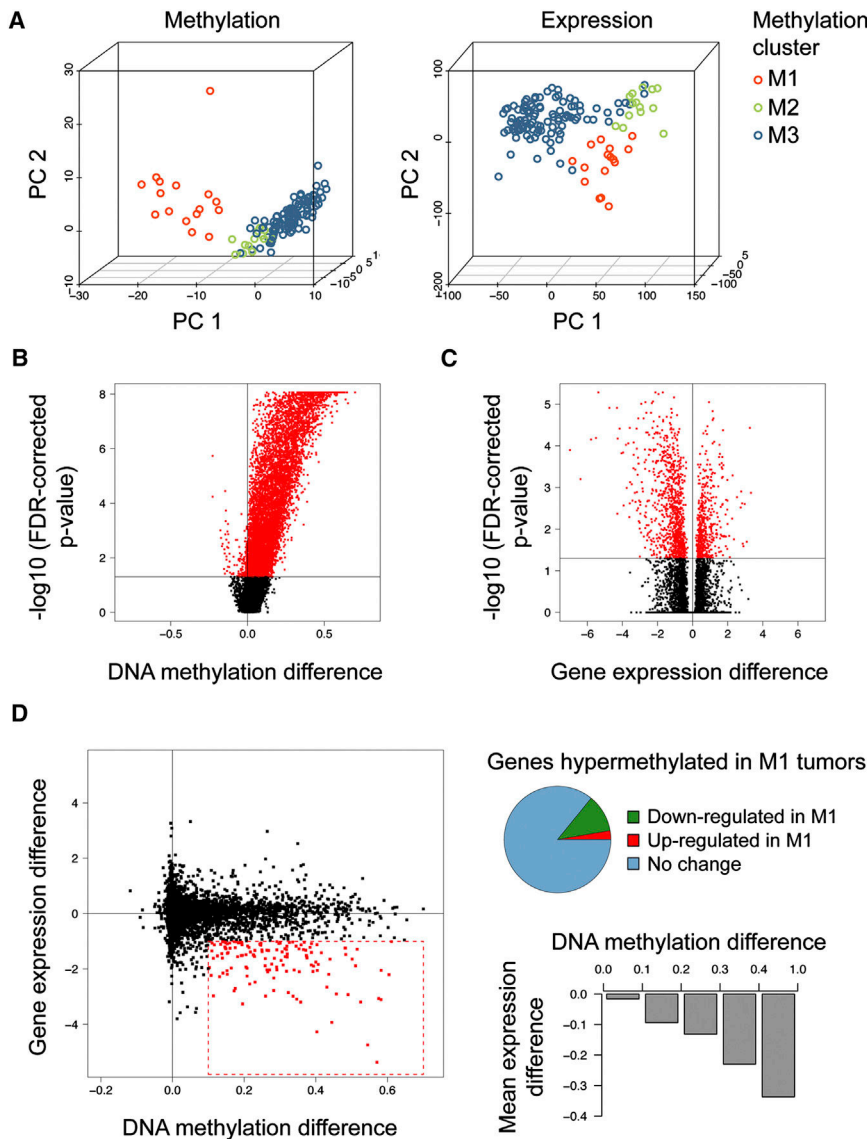


Figure 4. Transcriptional Changes Associated with the Hypermethylator Phenotype in SDH-Related PGL/PCC

(A) Principal component analysis of methylation (left) and expression (right) profiles of PGL/PCC. Tumor samples are plotted in three dimensions using their projections onto the first three principal components (PC). Methylation cluster membership is represented by a color code as described in the legend.

(B) Volcano plot analysis of differentially methylated CpG sites in tumors displaying a hyper-methylator phenotype (cluster M1). The beta value difference in DNA methylation between M1 and non-M1 tumors is plotted on the x axis, and the false-discovery rate (FDR)-adjusted significance is plotted on the y axis ($-\log_{10}$ scale). Red indicates probes differing significantly between groups.

(C) Volcano plot analysis of genes differentially expressed between M1 and non-M1 tumors.

(D) Integrated analysis of promoter DNA methylation and gene expression differences between M1 and non-M1 tumors. The starburst plot (left) represents the DNA methylation (x axis) and gene expression (y axis) differences between M1 and non-M1 tumors. Genes that are hypermethylated with a beta value difference > 0.1 and have a more than 2-fold decrease in expression levels in M1 tumors are shown as red data points. The pie chart (top right) shows the proportion of hypermethylated genes (FDR adjusted $p < 0.05$ and beta value difference > 0.1) that are significantly up- and downregulated in M1 tumors (gene expression difference > 1 and < -1 , respectively). The histogram (bottom right) shows the mean difference in gene expression levels between M1 and non-M1 tumors as a function of the amplitude of DNA methylation beta value differences. See also Figure S4 and Tables S6, S7, S8, and S9.

hemorrhagic fibromas. The p.Gly348Ala mutation has not been described previously and was predicted to be “probably damaging” by Polyphen software. Tumor HS_121 displayed a selective loss of FH activity (Figure 5B), accompanied by an increase in fumarate concentrations (Figure 5C). Fumarate, like succinate, is a competitive inhibitor of 2-OG-dependent dioxygenases (Xiao et al., 2012), so these findings strongly suggest that FH inactivation causes PGL/PCC by establishing a hyper-methylator phenotype.

DNA Hypermethylation and Associated Gene Silencing Are Stronger in *SDHB*-Mutated Tumors

SDHB-mutated PGL/PCC tend to be more malignant than tumors harboring mutations in other SDH subunits (Amar et al., 2005; Pasini and Stratakis, 2009). To determine whether this aggressive behavior is associated with a more severe hyper-methylator phenotype, we calculated the mean methylation level across all the CpG sites significantly hypermethylated in

in M2 and M3 tumors (Figure 6A); but, *SDHB*-mutated tumors displayed stronger hypermethylation than other M1 tumors (1 *SDHA*-, 1 *SDHC*-, 3 *SDHD*-, and 1 *FH*-mutated tumors) ($p = 0.0071$). We examined the transcriptional consequences of these differences by calculating the mean expression level of the 191 genes significantly hypermethylated and downregulated in M1 tumors (Table S8). Although these genes were downregulated in all M1 tumors as compared to M2 and M3 tumors, their expression was significantly lower in *SDHB*-mutated tumors than in other M1 tumors ($p = 0.0055$, Figure 6B). The levels of hypermethylation and downregulation of target genes were highly correlated (Pearson's $r = -0.93$, $p = 7.0 \times 10^{-59}$; Figure 6C), suggesting that DNA methylation finely regulates the expression of these genes in PGL/PCC. These findings support the idea that a stronger hyper-methylator phenotype, associated with a stronger downregulation of target genes, may participate to the metastatic phenotype of *SDHB*-mutated tumors.

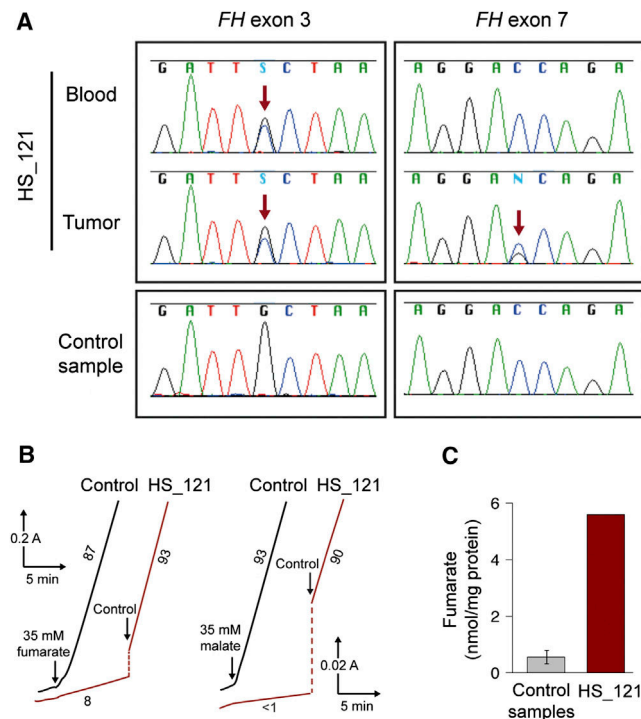


Figure 5. Inactivating *FH* Mutations in the Only Hypermethylated Tumor without *SDHx* Mutation

(A) Sanger sequencing of *FH* gene in DNA extracted from peripheral blood and frozen tumor from patient HS_121 identifies a heterozygous germline mutation (c.349G > C, p.Ala117Pro) in exon 3 and a heterozygous somatic mutation (c.1043G > C, p.Gly348Ala) in exon 7.

(B) Enzymatic activity, assayed spectrophotometrically for the forward (fumarate to malate, left traces) and backward (malate to fumarate, right traces) directions, reveals a severe fumarase deficiency in HS_121 (red) relative to control (black) PGL/PCC samples.

(C) Loss of fumarase activity is associated with a higher fumarate concentration in tumor HS_121 than that in control PGL/PCC (n = 6). For controls, data are mean \pm SEM. See also Table S10.

Comparison with the CpG Island Methylator Phenotypes Identified in Colorectal Cancer and Glioblastoma

We investigated whether the hypermethylator phenotype identified in PGL/PCC showed similarities with previously described CIMP phenotypes. We analyzed publicly available data concerning colorectal cancers (Hinoue et al., 2012) and glioblastomas (Noushmehr et al., 2010), obtained with the same Illumina Infinium HM27 methylation array used in this study. For each CpG site, we calculated the mean beta value difference between tumors with and without a hypermethylator phenotype (CIMP-high in colorectal cancer, G-CIMP in glioblastoma). Although we found a significant overlap between hypermethylated loci in the three cancers, the patterns of hypermethylation were particularly similar between PGL/PCC and G-CIMP glioblastomas (Figure 7A). Of 2,241 CpG sites hypermethylated in PGL/PCC of the M1 subgroup (mean beta value difference >0.2 as compared to non-M1 tumors), 847 (38%) were also hypermethylated in G-CIMP glioblastomas, whereas only 279 (12%) were hypermethylated in CIMP-high-colorectal tumors (Figure 7B). Gene set enrichment analysis (GSEA) confirmed that the set of genes hypermethylated in PGL/PCC was more significantly

enriched in genes hypermethylated in G-CIMP glioblastomas (enrichment score = 0.75) than genes hypermethylated in CIMP-high-colorectal cancers (enrichment score = 0.47) (Figure S5). Seventeen of the 191 genes epigenetically silenced in PGL/PCC were significantly hypermethylated and downregulated in glioblastoma (including *PNMT* and *RBP1*); 21 were hypermethylated but without significant downregulation (like *KRT19*); and 119, like *NPY*, were not found to be hypermethylated in glioblastoma (Table S8). The similarity between PGL/PCC and glioblastoma hypermethylator phenotypes may reflect the preferential activities of the 2-OG-dependent demethylases inhibited in these two cancers.

DISCUSSION

Metabolic reprogramming in cancer has long been regarded as an indirect response to cell proliferation, but recent evidence has shown that metabolites themselves can be oncogenic by altering several cellular processes (Ward and Thompson, 2012). The oncometabolite 2-HG, produced by mutated IDH enzymes, establishes the G-CIMP phenotype in glioma by inhibiting DNA and histone demethylases (Xu et al., 2011). Succinate and fumarate can activate the oncogenic HIF pathway by inhibiting HIF prolyl-hydroxylases (Brière et al., 2005; Selak et al., 2005). Here, we demonstrate that succinate accumulation in SDH-deficient PGL/PCC establishes a hypermethylator phenotype, by inhibiting 2-OG-dependent oxidative demethylation. Besides, we describe a specific model of SDH-related PGL/PCC, generated by knocking out *Sdhb* gene in chromaffin cells. In the past, the lack of an appropriate cellular model has opposed severe limitations to the understanding of SDH-related oncogenesis. Our model displays a complete inactivation of SDH activity, which cannot be achieved by siRNA-mediated gene silencing, and will be a crucial tool for deciphering the consequences of SDH inactivation in these cells. Our study also led to the identification of a case of *FH* germline mutation in an apparently sporadic PCC displaying a hypermethylator phenotype. *FH* mutations are known to predispose to hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer (Tomlinson et al., 2002) but have never been described in PGL/PCC. Altogether, these findings shed light on a novel pathway explaining the tumor-suppressive role of SDH and FH and, echoing the role of *IDH* mutation in glioma, emphasize the link between TCA cycle dysfunction and epigenomic alterations in cancer. Gastrointestinal stromal tumors, renal cancer, and leiomyomas harboring *SDH* or *FH* mutations may also display epigenetic reprogramming, which should be assessed in future DNA methylation studies.

Many cancer-specific hypermethylation events occur in promoter regions of genes that are not normally expressed and are therefore not affected by DNA methylation changes (Widschwendter et al., 2007). To distinguish DNA methylation events of potential functional significance (“driver events”) from these “passenger events”, we integrated the DNA methylation data with gene expression profiles of the same tumors. Only 11.5% of genes with significant promoter hypermethylation in PGL/PCC of the M1 subgroup were underexpressed in these tumors. This is consistent with previous reports in colorectal cancer (7.3%; Hinoue et al., 2012) and glioblastoma (17%; Noushmehr

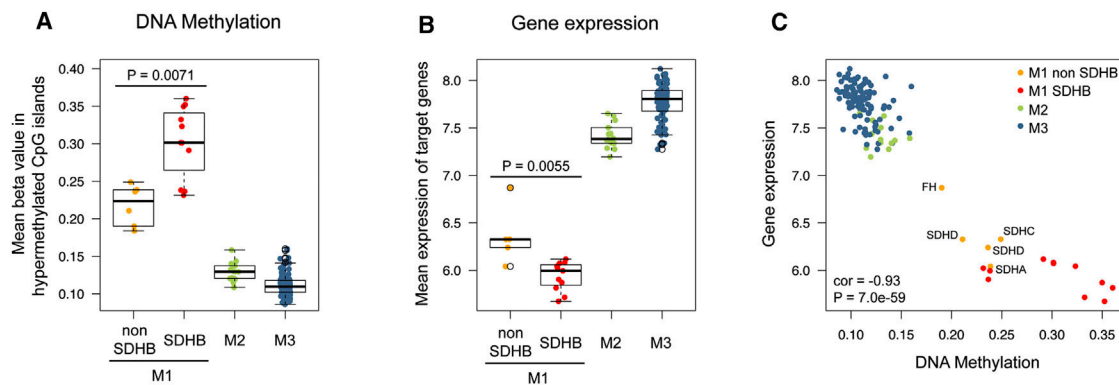


Figure 6. The Hypermethylator Phenotype Is Particularly Severe in *SDHB*-Mutated Tumors

(A) Mean methylation of all CpG island probes significantly hypermethylated in M1 tumors, according to tumor subgroup. Box-and-whisker plots show the distribution of mean beta values relative to each DNA methylation subgroup. M1 tumors are separated into *SDHB*-mutated and *SDHB*-wild-type tumors. The middle bar, median; box, interquartile range; bars extend to 1.5 times the interquartile range.

(B) Mean expression of genes significantly hypermethylated and downregulated in M1 tumors, according to tumor subgroup.

(C) Distribution of mean expression levels of target genes relative to the mean methylation levels of CpG sites hypermethylated in M1 tumors. Tumor subgroups are represented with a color code, and the mutations of non-*SDHB*-mutated M1 tumors are indicated next to each dot.

et al., 2010). Thus, most hypermethylated CpG sites appear to be silent consequences of the inhibition of DNA demethylases, with no evident functional impact. We were however able to show an overall correlation between the level of hypermethylation and downregulation of gene expression. In particular, we identified 191 genes that showed significant hypermethylation and downregulation in M1 tumors and whose expression was closely correlated with the degree of DNA methylation.

Two of the genes showing the strongest evidence for epigenetic silencing in hypermethylated PGL/PCC are, respectively, involved in the differentiation of chromaffin cells (*PNMT*; Eisenhofer et al., 2011) and the epithelial-to-mesenchymal transition (*KRT19*; Moreno-Bueno et al., 2006), which was recently identified as the first mechanistic clue to explain the particularly invasive phenotype of *SDHB*-related tumors (Loriot et al., 2012). The *PNMT* gene encodes the phenyl-ethanolamine-N-methyltransferase, a key enzyme of chromaffin cell metabolism, which catalyzes the conversion of noradrenaline to adrenaline. Reduced *PNMT* expression has been reported in SDH-related tumors, leading to an immature catecholamine secretory profile with predominant secretion of noradrenaline or dopamine (Burnichon et al., 2012b; Eisenhofer et al., 2001). Our findings reveal that *PNMT* is hypermethylated in SDH-related tumors, together with four other genes implicated in catecholamine metabolism (*DRD2*, *SULT1A1*, *SLC6A2*, and *NPY*). Epigenetic regulation is thus a previously unsuspected mechanism explaining the dedifferentiated phenotype of this subgroup of PGL/PCC. Another target of the PGL/PCC hypermethylator phenotype, *RBP1*, is also epigenetically silenced in G-CIMP gliomas (Noushmehr et al., 2010) and several cancer cell lines and primary tumors (Esteller et al., 2002). *RBP1* is involved in retinoic acid signaling, leading to loss of cell differentiation and tumor progression (Farias et al., 2005) and may thus have a tumor-suppressive role in PGL/PCC. Studies aimed at elucidating the functional consequences of epigenetic gene silencing will undoubtedly improve our understanding of the role of DNA hypermethylation in PGL/PCC tumorigenesis.

SDH- and VHL-related tumors were previously shown to have similar gene expression features, like the activation of hypoxia-related genes (Dahia et al., 2005). In the COMETE cohort, we showed that, although close, these tumors were classified in two separate gene expression clusters (C1A and C1B) (Burnichon et al., 2011). Here, we found that 150 out of 344 genes (44%) significantly downregulated in SDH- as compared to VHL-tumors were hypermethylated (data not shown). Epigenetic remodeling thus explains a significant part of transcriptional differences between SDH- and VHL-related tumors.

SDHB mutations confer a much worse prognosis than mutations in other *SDHx* genes (Amar et al., 2007). No mechanism has been proposed to explain these differences. We found that although all *SDHx*-mutated tumors displayed a hypermethylator phenotype, the level of hypermethylation was significantly higher, and the expression of target genes was significantly lower in *SDHB*-mutated tumors. As target genes include genes implicated in neuroendocrine differentiation and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), this may explain the particular malignancy of *SDHB*-mutated tumors. *SDHB* encodes a catalytic subunit of SDH (Rutter et al., 2010). We hypothesize that SDH inactivation may be more complete in *SDHB*-mutated tumors than in tumors harboring mutations in other subunits, leading to a higher succinate accumulation and hence to a stronger inhibition of 2-OG-dependent demethylation. However, we were not able to detect significant differences in succinate concentrations between *SDHB*-mutated and other SDH-related tumors. Future studies will be needed to dissect the functional impact of mutations affecting different SDH subunits.

There have recently been several promising findings for epigenetic cancer therapy. Notably, Tsai et al. (2012) demonstrated that low doses of the DNA demethylating agents, DAC and azacitidine, had durable antitumor effects on hematological and epithelial tumor cells. Thus, low doses may help avoid the extreme toxicities of these agents at high dose that have prevented the investigation of the true clinical responses. We show

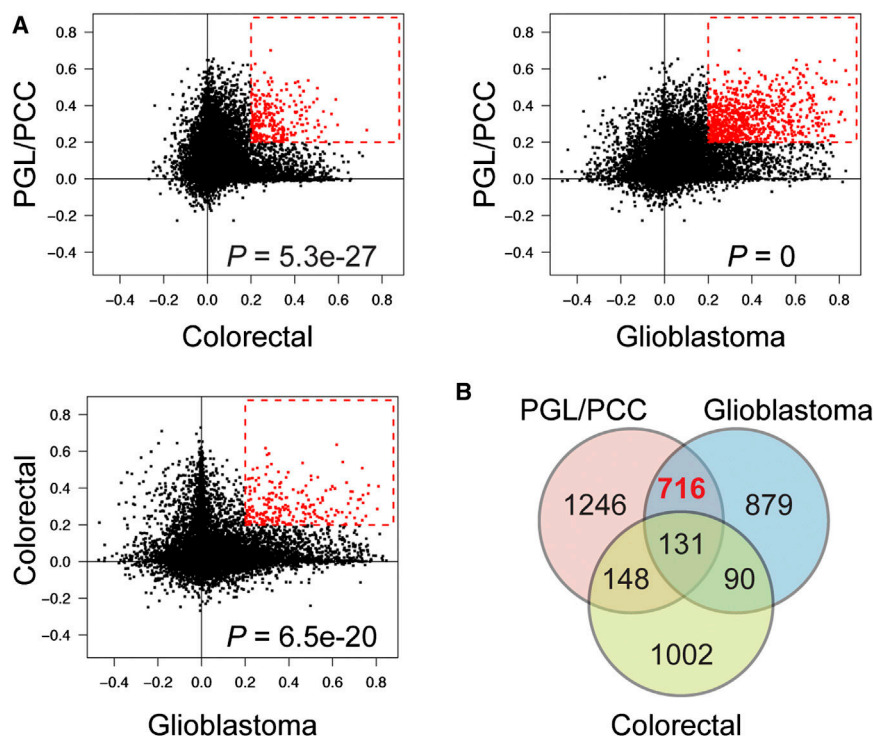


Figure 7. Comparison of Hypermethylator Phenotypes in PGL/PCC, Colorectal Cancer, and Glioblastoma

(A) Correlation between CIMP-specific hypermethylation patterns in the three cancers. The mean beta value difference between CIMP and non-CIMP tumors was calculated for all CpG sites in each cancer type. Each scatterplot represents the correlation of beta value differences between two cancers. Red dots indicate CpG sites hypermethylated in the CIMP subgroups of both cancers (beta value difference >0.2 between CIMP and non-CIMP tumors).

(B) Venn diagram showing hypermethylated loci shared by the PGL/PCC hypermethylator phenotype, the colorectal cancer CIMP-high phenotype, and the glioblastoma G-CIMP phenotype. See also Figure S5.

that the increased migratory capacities of *Sdhb*^{-/-} mouse chromaffin cells are repressed by transient DAC treatment, even at a 10 nM concentration, which led to minor cytotoxicity. The precise molecular changes associated with these treatments will have to be deciphered in future studies, both in vitro and in vivo. In view of these findings, the reversal of promoter DNA hypermethylation and associated gene silencing may rise as an attractive alternative approach to surgery for *SDHx*- and *FH*-mutated PGL/PCC. NPY, which shows the strongest transcriptional silencing in M1 tumors, may be a good marker. NPY levels were shown to be increased in the plasma and tumors of patients with PCC and to be significantly lower in extra-adrenal tumors (deS Senanayake et al., 1995). A comprehensive study of candidate markers in a large independent cohort will be useful to determine the best marker of this aggressive subgroup.

In summary, our analysis indicates that PGL/PCC can be classified into three distinct subgroups according to genome-scale DNA methylation changes. The identification of a hypermethylator phenotype in *SDHx*- and *FH*-mutated tumors helps in explaining both the tumor-suppressive role of these genes and some of the phenotypic characteristics of these tumors. The malignancy of *SDHB*-mutated PGL/PCC may be due to a severe epigenetic silencing of genes involved in cell differentiation and EMT. These findings have clinical implications for PGL/PCC diagnosis and may lead to targeted epigenetic treatment for patients with TCA cycle alterations.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Collection and Processing of PGL/PCC and Normal Tissue Samples

A total of 145 tumor samples from 145 different patients recruited in the COMETE network from 1993 to 2008 were included in the study. Ethical approval for the study was obtained from the institutional review board

QIAamp DNA Mini Kit or an AllPrep Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). For details, see the Supplemental Experimental Procedures.

DNA Methylation Arrays

Whole-genome DNA methylation was analyzed in 145 PGL or PCC and three normal adrenal medulla samples using the Illumina Infinium HumanMethylation27 assay (Bibikova et al., 2009). Twenty-four samples were later reanalyzed using the more comprehensive Illumina Infinium HumanMethylation450 Beadchips. Microarray experiments were performed by Integrigen SA (Evry, France). In brief, genomic DNA was bisulfite-converted using the EZ-96 DNA Methylation Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA), whole-genome amplified, enzymatically fragmented, and hybridized to the BeadChip arrays in accordance with the manufacturer's instructions. The beta value DNA methylation scores for each locus were extracted together with detection p values from Illumina GenomeStudio software. As described elsewhere (Hinoue et al., 2012), we replaced data points with a detection p value >0.05 by "NA" values, and we masked data points as "NA" for 4,484 probes that contain single-nucleotide polymorphisms or overlap with a repetitive element that are not uniquely aligned to the human genome (NCBI build 36/Hg18) or that overlap with regions of insertions and deletions in the human genome. Probes were considered to be in a promoter CpG island if they were located within a CpG island (UCSC database) and less than 1,500 bp away from a transcription start site.

DNA Methylation-Based Classification of Pheochromocytomas and Paragangliomas

We used consensus clustering (Monti et al., 2003) to identify PGL/PCC subgroups on the basis of their DNA methylation profiles. We selected the 10% most variant probes ($n = 2,152$) among those that did not contain any «NA»-masked data point. We then established consensus partitions of the data set in K clusters (for $K = 2, 3, \dots, 8$), based on 1,000 resampling iterations of hierarchical clustering, with Pearson's dissimilarity as the distance metric and Ward's method for linkage analysis. We used the cumulative distribution functions (CDF) of the consensus matrices to determine the optimal number of clusters, considering both the shape of the functions and the area under the CDF curves (Figure S1). The Bioconductor ConsensusClusterPlus package was used for consensus clustering analysis.

Reduced Representation Bisulphite Sequencing Analysis of Mouse Chromaffin Cells

RRBS was performed by Integragen SA (Evry, France), as described elsewhere (Gu et al., 2011; Smallwood and Kelsey, 2012). In brief, 300 ng of mouse genomic DNA were digested with 14 units of MspI (NEB). After end-repair, A-tailing, and ligation to methylated Illumina adapters, the library fragments of 40–220 bp were gel isolated, subjected to a double bisulfite conversion with the EpiTect Bisulfite kit from QIAGEN, PCR amplified, and sequenced on an Illumina HiSeq2000 sequencer as paired-end 75 bp reads. We used Trim Galore! (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore) to filter out the adaptor sequences. Bisulfite mapping and methylation calling were performed in a single step using the bismark software (Krueger and Andrews, 2011). Only reads uniquely aligned to the mm9 assembly of the mouse genome were retained, and we required a coverage of at least ten reads to call methylation score for a CpG site. We downloaded the list of Mouse CpG islands from the UCSC genome browser, and we inferred a DNA methylation rate to each CpG island with more than ten individual CpG measurements and more than 100 total reads. To identify differentially methylated CpG sites or CpG islands, we compared the number of methylated and unmethylated observations in WT and *Sdhb*^{−/−} cells using Fisher's exact test. CpG islands with an FDR-adjusted p value <0.05 and absolute methylation difference >5% were considered differentially methylated. Human and mouse orthologs were downloaded from the Mouse Genome Database (Eppig et al., 2012).

Generation of *Sdhb*^{−/−} Immortalized Mouse Chromaffin Cells

Sdhb-floxed mice were generated at the Mouse Clinical Institute (Illkirch, France). A targeting vector containing *Sdhb* exon 2 flanked by LoxP sites followed by a neomycin (neo) selection cassette flanked by Frt sites (Figure 2A) was introduced into P1 (129 S2/SvPas) ES cells by electroporation. Two positive embryonic stem clones were injected into C57BL/6J blastocysts, and the resulting male chimeras gave germline transmission. These mice were mated to Flipase-expressing mice to delete the *Neo* cassette. *Sdhb*^{+/lox} mice were intercrossed to obtain *Sdhb*^{lox/lox} mice, and mouse chromaffin cells (mCCs) were isolated from the adrenal medulla of these *Sdhb*^{lox/lox} as described elsewhere (Kolski-Andreaco et al., 2007). All studies were performed in accordance with the relevant guidelines of the French Ministry of Agriculture (Authorization Executive Order A751532) for scientific experimentation on animals, European Communities Council Directive, and international ethical standards. Cells were cultured at 37°C, under 5% CO₂ in a standard medium containing Dulbecco's modified Eagle's medium with glutamine and a high glucose concentration (DMEM glutaMAX, GIBCO, Life Technologies, Saint Aubin, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO) and 1% penicillin-streptomycin (GIBCO). The cultures remained quiescent for 6 months, after which some started to grow spontaneously from mCCs clusters. These immortalized cells were isolated and infected with 10⁷ plaque-forming units (pfu)/ml of an adenovirus expressing Cre-recombinase (Ad5CMV-Cre, Cell BioLabs, San Diego). A clonal approach by limiting dilution cloning assay was used to obtain homogeneous *Sdhb*^{−/−} immortalized mCCs clones (imCC clones 6 and 8). *Sdhb*^{−/−} and *Sdhb*^{lox/lox} (referred to as WT) imCCs were maintained in standard medium with or without 2.5 mM dimethyl 2-oxoglutarate (Sigma-Aldrich, St. Louis).

ACCESSION NUMBERS

Methylation array data from the 148 human samples and RRBS data from the four mouse cell lines analyzed in this study have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) and are accessible through the GEO series accession number GSE43298.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes ten tables, five figures, and Supplemental Experimental Procedures and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2013.04.018>.

ACKNOWLEDGMENTS

This work is part of the "Cartes d'Identité des Tumeurs (CIT) program" funded and developed by the "Ligue Nationale contre le Cancer" (<http://cit.ligue-cancer.net>).

We express our gratitude to Profs. Pierre-François Plouin and Xavier Bertagna for making this work possible by creating the COMETE Network 20 years ago. We are grateful to Prof. X. Jeunemaitre for helpful discussions and continual support. We thank Dr. Juliette Hadchouel for her technical advice and the Mouse Clinical Institute for generating the *Sdhb*^{+/lox} mouse. We thank Jacqueline Godet and Jacqueline Metral for their strong support within the CIT program. We also thank Nabila Elarouci, Dr. Rossella Libé, Prof. Cécile Badoual, and Dr. Frédérique Tissier for their help, all members of the HEGP Genetics department, and Catherine Tritscher for technical assistance. We also thank Mélanie Letexier and Maud Vandpeene from IntegraGen for their efficacy in generating methylation data. The text was edited by Alex Edelman and associates. The work leading to these results has received funding from the Agence Nationale de la Recherche (ANR 08 GENOPATH 029 MitOxy and ANR-2011-JCJC-00701 MODEOMAPP), the GtS-Institut des Maladies Rares, and the Programme Hospitalier de Recherche Clinique grant COMETE 3 (AOM 06 179). The work leading to these results has received funding from the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement number 259735.

Received: October 13, 2012

Revised: January 29, 2013

Accepted: April 20, 2013

Published: May 23, 2013

REFERENCES

- Amar, L., Bertherat, J., Baudin, E., Aizenberg, C., Bressac-de Paillerets, B., Chabre, O., Chamontin, B., Delemer, B., Giraud, S., Murat, A., et al. (2005). Genetic testing in pheochromocytoma or functional paraganglioma. *J. Clin. Oncol.* 23, 8812–8818.
- Amar, L., Baudin, E., Burnichon, N., Peyrard, S., Silvera, S., Bertherat, J., Bertagna, X., Schlumberger, M., Jeunemaitre, X., Gimenez-Roqueplo, A.P., and Plouin, P.F. (2007). Succinate dehydrogenase B gene mutations predict survival in patients with malignant pheochromocytomas or paragangliomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 3822–3828.
- Baysal, B.E., Ferrell, R.E., Willett-Brozick, J.E., Lawrence, E.C., Myssiorek, D., Bosch, A., van der Mey, A., Taschner, P.E., Rubinstein, W.S., Myers, E.N., et al. (2000). Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science* 287, 848–851.
- Bibikova, M., Le, J., Barnes, B., Saedinia-Melnyk, S., Zhou, L., Shen, R., and Gunderson, K.L. (2009). Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium® assay. *Epigenomics* 1, 177–200.
- Brière, J.J., Favier, J., Bénit, P., El Ghouzzi, V., Lorenzato, A., Rabier, D., Di Renzo, M.F., Gimenez-Roqueplo, A.P., and Rustin, P. (2005). Mitochondrial succinate is instrumental for HIF1α nuclear translocation in SDHA-mutant fibroblasts under normoxic conditions. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3263–3269.
- Burnichon, N., Vescovo, L., Amar, L., Libé, R., de Reynies, A., Venisse, A., Jouanno, E., Laurendeau, I., Parfait, B., Bertherat, J., et al. (2011). Integrative genomic analysis reveals somatic mutations in pheochromocytoma and paraganglioma. *Hum. Mol. Genet.* 20, 3974–3985.
- Burnichon, N., Buffet, A., Parfait, B., Letouzé, E., Laurendeau, I., Lorient, C., Pasmant, E., Abermil, N., Valeyrie-Allanore, L., Bertherat, J., et al. (2012a). Somatic NF1 inactivation is a frequent event in sporadic pheochromocytoma. *Hum. Mol. Genet.* 27, 5397–5405.
- Burnichon, N., Cascón, A., Schiavi, F., Morales, N.P., Comino-Méndez, I., Abermil, N., Inglada-Pérez, L., de Cubas, A.A., Amar, L., Barontini, M., et al. (2012b). MAX mutations cause hereditary and sporadic pheochromocytoma and paraganglioma. *Clin. Cancer Res.* 18, 2828–2837.
- Cedar, H., and Bergman, Y. (2009). Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat. Rev. Genet.* 10, 295–304.

- Dahia, P.L., Ross, K.N., Wright, M.E., Hayashida, C.Y., Santagata, S., Barontini, M., Kung, A.L., Sanso, G., Powers, J.F., Tischler, A.S., et al. (2005). A HIF1alpha regulatory loop links hypoxia and mitochondrial signals in pheochromocytomas. *PLoS Genet.* 1, 72–80.
- deS Senanayake, P., Denker, J., Bravo, E.L., and Graham, R.M. (1995). Production, characterization, and expression of neuropeptide Y by human pheochromocytoma. *J. Clin. Invest.* 96, 2503–2509.
- Eisenhofer, G., Walther, M.M., Huynh, T.T., Li, S.T., Bornstein, S.R., Vortmeyer, A., Mannelli, M., Goldstein, D.S., Linehan, W.M., Lenders, J.W., and Pacak, K. (2001). Pheochromocytomas in von Hippel-Lindau syndrome and multiple endocrine neoplasia type 2 display distinct biochemical and clinical phenotypes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 1999–2008.
- Eisenhofer, G., Pacak, K., Huynh, T.T., Qin, N., Bratslavsky, G., Linehan, W.M., Mannelli, M., Friberg, P., Grebe, S.K., Timmers, H.J., et al. (2011). Catecholamine metabolomic and secretory phenotypes in pheochromocytoma. *Endocr. Relat. Cancer* 18, 97–111.
- Eppig, J.T., Blake, J.A., Bult, C.J., Kadin, J.A., and Richardson, J.E.; Mouse Genome Database Group. (2012). The Mouse Genome Database (MGD): comprehensive resource for genetics and genomics of the laboratory mouse. *Nucleic Acids Res.* 40(Database issue), D881–D886.
- Esteller, M., Guo, M., Moreno, V., Peinado, M.A., Capella, G., Galm, O., Baylin, S.B., and Herman, J.G. (2002). Hypermethylation-associated inactivation of the cellular retinol-binding-protein 1 gene in human cancer. *Cancer Res.* 62, 5902–5905.
- Farias, E.F., Ong, D.E., Ghyselinck, N.B., Nakajo, S., Kuppumbatti, Y.S., and Mira y Lopez, R. (2005). Cellular retinol-binding protein I, a regulator of breast epithelial retinoic acid receptor activity, cell differentiation, and tumorigenicity. *J. Natl. Cancer Inst.* 97, 21–29.
- Favier, J., Brière, J.J., Burnichon, N., Rivière, J., Vescovo, L., Benit, P., Giscos-Douriez, I., De Reyniès, A., Bertherat, J., Badoual, C., et al. (2009). The Warburg effect is genetically determined in inherited pheochromocytomas. *PLoS ONE* 4, e7094.
- Favier, J., Buffet, A., and Gimenez-Roqueplo, A.P. (2012). HIF2A mutations in paraganglioma with polycythemia. *N. Engl. J. Med.* 367, 2161, author reply 2161–2162.
- Feinberg, A.P., and Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 307, 89–92.
- Geli, J., Kiss, N., Karimi, M., Lee, J.J., Bäckdahl, M., Ekström, T.J., and Larsson, C. (2008). Global and regional CpG methylation in pheochromocytomas and abdominal paragangliomas: association to malignant behavior. *Clin. Cancer Res.* 14, 2551–2559.
- Gimenez-Roqueplo, A.P., Dahia, P.L., and Robledo, M. (2012). An update on the genetics of paraganglioma, pheochromocytoma, and associated hereditary syndromes. *Horm. Metab. Res.* 44, 328–333.
- Gimenez-Roqueplo, A.P., Favier, J., Rustin, P., Mourad, J.J., Plouin, P.F., Corvol, P., Rötig, A., and Jeunemaitre, X. (2001). The R22X mutation of the SDHD gene in hereditary paraganglioma abolishes the enzymatic activity of complex II in the mitochondrial respiratory chain and activates the hypoxia pathway. *Am. J. Hum. Genet.* 69, 1186–1197.
- Gimenez-Roqueplo, A.P., Favier, J., Rustin, P., Rieubland, C., Crespin, M., Nau, V., Khau Van Kien, P., Corvol, P., Plouin, P.F., and Jeunemaitre, X.; COMETE Network. (2003). Mutations in the SDHB gene are associated with extra-adrenal and/or malignant pheochromocytomas. *Cancer Res.* 63, 5615–5621.
- Gu, H., Smith, Z.D., Bock, C., Boyle, P., Gnirke, A., and Meissner, A. (2011). Preparation of reduced representation bisulfite sequencing libraries for genome-scale DNA methylation profiling. *Nat. Protoc.* 6, 468–481.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hinoue, T., Weisenberger, D.J., Lange, C.P., Shen, H., Byun, H.M., Van Den Berg, D., Malik, S., Pan, F., Noushmehr, H., van Dijk, C.M., et al. (2012). Genome-scale analysis of aberrant DNA methylation in colorectal cancer. *Genome Res.* 22, 271–282.
- Houseman, E.A., Christensen, B.C., Yeh, R.F., Marsit, C.J., Karagas, M.R., Wrensch, M., Nelson, H.H., Wiemels, J., Zheng, S., Wiencke, J.K., and Kelsey, K.T. (2008). Model-based clustering of DNA methylation array data: a recursive-partitioning algorithm for high-dimensional data arising as a mixture of beta distributions. *BMC Bioinformatics* 9, 365.
- Janeway, K.A., Kim, S.Y., Lodish, M., Nosé, J., Rustin, P., Gaal, J., Dahia, P.L., Liegl, B., Ball, E.R., Raygada, M., et al.; NIH Pediatric and Wild-Type GIST Clinic. (2011). Defects in succinate dehydrogenase in gastrointestinal stromal tumors lacking KIT and PDGFRA mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 314–318.
- Jones, P.A., and Baylin, S.B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell* 128, 683–692.
- Kolski-Andreaco, A., Cai, H., Currie, D.S., Chandy, K.G., and Chow, R.H. (2007). Mouse adrenal chromaffin cell isolation. *J. Vis. Exp.* 2007 Jan 5, 129.
- Krueger, F., and Andrews, S.R. (2011). Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics* 27, 1571–1572.
- Laird, P.W. (2003). The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat. Rev. Cancer* 3, 253–266.
- Lenders, J.W., Eisenhofer, G., Mannelli, M., and Pacak, K. (2005). Pheochromocytoma. *Lancet* 366, 665–675.
- Loriot, C., Burnichon, N., Gadessaud, N., Vescovo, L., Amar, L., Libé, R., Bertherat, J., Plouin, P.F., Jeunemaitre, X., Gimenez-Roqueplo, A.P., and Favier, J. (2012). Epithelial to mesenchymal transition is activated in metastatic pheochromocytomas and paragangliomas caused by SDHB gene mutations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, E954–E962.
- Meissner, A., Gnirke, A., Bell, G.W., Ramsahoye, B., Lander, E.S., and Jaenisch, R. (2005). Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Res.* 33, 5868–5877.
- Monti, S., Tamayo, P., Mesirov, J.P., and Golub, T.R. (2003). Consensus clustering. A resampling-based method for class discovery and visualization of gene-expression microarray data. *Mach. Learn.* 52, 91–118.
- Moreno-Bueno, G., Cubillo, E., Sarrió, D., Peinado, H., Rodríguez-Pinilla, S.M., Villa, S., Bolós, V., Jordá, M., Fabra, A., Portillo, F., et al. (2006). Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 66, 9543–9556.
- Neumann, H.P., Bausch, B., McWhinney, S.R., Bender, B.U., Gimm, O., Franke, G., Schipper, J., Klisch, J., Althoefer, C., Zerres, K., et al.; Freiburg-Warsaw-Columbus Pheochromocytoma Study Group. (2002). Germ-line mutations in nonsyndromic pheochromocytoma. *N. Engl. J. Med.* 346, 1459–1466.
- Noushmehr, H., Weisenberger, D.J., Diefes, K., Phillips, H.S., Pujara, K., Berman, B.P., Pan, F., Pelloski, C.E., Sulman, E.P., Bhat, K.P., et al.; Cancer Genome Atlas Research Network. (2010). Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* 17, 510–522.
- Pasini, B., and Stratakis, C.A. (2009). SDH mutations in tumorigenesis and inherited endocrine tumours: lesson from the pheochromocytoma-paraganglioma syndromes. *J. Intern. Med.* 266, 19–42.
- Pencheva, N., Tran, H., Buss, C., Huh, D., Drobnjak, M., Busam, K., and Tavazoie, S.F. (2012). Convergent multi-miRNA targeting of ApoE drives LRP1/LRP8-dependent melanoma metastasis and angiogenesis. *Cell* 151, 1068–1082.
- Pollard, P.J., Brière, J.J., Alam, N.A., Barwell, J., Barclay, E., Wortham, N.C., Hunt, T., Mitchell, M., Olpin, S., Moat, S.J., et al. (2005). Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1alpha in tumours which result from germline FH and SDH mutations. *Hum. Mol. Genet.* 14, 2231–2239.
- Ricketts, C., Woodward, E.R., Killick, P., Morris, M.R., Astuti, D., Latif, F., and Maher, E.R. (2008). Germline SDHB mutations and familial renal cell carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 100, 1260–1262.
- Rodríguez-Paredes, M., and Esteller, M. (2011). Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat. Med.* 17, 330–339.

- Rutter, J., Winge, D.R., and Schiffman, J.D. (2010). Succinate dehydrogenase - assembly, regulation and role in human disease. *Mitochondrion* 10, 393–401.
- Selak, M.A., Armour, S.M., MacKenzie, E.D., Boulahbel, H., Watson, D.G., Mansfield, K.D., Pan, Y., Simon, M.C., Thompson, C.B., and Gottlieb, E. (2005). Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* 7, 77–85.
- Takai, D., and Jones, P.A. (2002). Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 3740–3745.
- Tomlinson, I.P., Alam, N.A., Rowan, A.J., Barclay, E., Jaeger, E.E., Kelsell, D., Leigh, I., Gorman, P., Lamlum, H., Rahman, S., et al.; Multiple Leiomyoma Consortium. (2002). Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat. Genet.* 30, 406–410.
- Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J.G., Baylin, S.B., and Issa, J.P. (1999). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8681–8686.
- Tsai, H.C., Li, H., Van Neste, L., Cai, Y., Robert, C., Rassool, F.V., Shin, J.J., Harbom, K.M., Beaty, R., Pappou, E., et al. (2012). Transient low doses of DNA-demethylating agents exert durable antitumor effects on hematological and epithelial tumor cells. *Cancer Cell* 21, 430–446.
- van Nederveen, F.H., Gaal, J., Favier, J., Korpershoek, E., Oldenburg, R.A., de Bruyn, E.M., Sleddens, H.F., Derkx, P., Rivière, J., Dannenberg, H., et al. (2009). An immunohistochemical procedure to detect patients with paraganglioma and pheochromocytoma with germline SDHB, SDHC, or SDHD gene mutations: a retrospective and prospective analysis. *Lancet Oncol.* 10, 764–771.
- Smallwood, S.A., and Kelsey, G. (2012). Genome-wide analysis of DNA methylation in low cell numbers by reduced representation bisulfite sequencing. *Methods Mol. Biol.* 925, 187–197.
- Ward, P.S., and Thompson, C.B. (2012). Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell* 21, 297–308.
- Widschwendter, M., Fiegl, H., Egle, D., Mueller-Holzner, E., Spizzo, G., Marth, C., Weisenberger, D.J., Campan, M., Young, J., Jacobs, I., and Laird, P.W. (2007). Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nat. Genet.* 39, 157–158.
- Xiao, M., Yang, H., Xu, W., Ma, S., Lin, H., Zhu, H., Liu, L., Liu, Y., Yang, C., Xu, Y., et al. (2012). Inhibition of α -KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. *Genes Dev.* 26, 1326–1338.
- Xu, W., Yang, H., Liu, Y., Yang, Y., Wang, P., Kim, S.H., Ito, S., Yang, C., Wang, P., Xiao, M.T., et al. (2011). Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell* 19, 17–30.
- Young, R.M., and Simon, M.C. (2012). Untuning the tumor metabolic machine: HIF- α : pro- and antitumorigenic? *Nat. Med.* 18, 1024–1025.

Metabolic re-wiring in succinate dehydrogenase deficient cells

Charlotte Lepoutre-Lussey^{1,2,3,4}, Kate ER Hollinshead^{4,5}, Christian Ludwig^{5,6}, Mélanie Menara^{1,2,6}, Aurélie Morin^{1,2}, Luis-Jaime Castro-Vega^{1,2}, Maxime Janin^{2,7,8}, Cosimo Martinelli^{1,2}, Chris Ottolenghi^{2,7,8}, Anne-Paule Gimenez-Roqueplo^{1,2,3}, Judith Favier^{1,2,9} and Daniel A Tennant^{5,9}.

¹INSERM, UMR970, Paris-Cardiovascular Research Center at HEGP, Paris, France

² Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, F-75006 Paris, France

³Department of Genetics, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

⁴These authors contributed equally to the manuscript

⁵School of Cancer Sciences, University of Birmingham, Birmingham, UK

⁶These authors contributed equally to the manuscript

⁷Metabolic Biochemistry, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France

⁸INSERM, Unit 1124, Paris, France

⁹These authors contributed equally to the manuscript

Correspondence should be addressed to:

Dr. Judith Favier
Paris-Centre de recherche cardiovasculaire de l'HEGP (PARCC)
56 rue Leblanc
75015 Paris, France
Tel: 00 33 1 53 98 80 41
E-mail: judith.favier@inserm.fr

Dr. Daniel A Tennant
School of Cancer Sciences
College of Medical and Dental Sciences
University of Birmingham
Edgbaston
Birmingham. B15 2TT
Tel: 0121 414 8651
Email: d.tennant@bham.ac.uk

The tricarboxylic acid (TCA) cycle is a central metabolic pathway responsible for supplying reducing potential for oxidative phosphorylation and anabolic substrates for cell growth, repair and proliferation. It co-ordinates the metabolism of major anabolic precursors such as glucose and glutamine with the catabolism of carbon sources for fuel. As such, it might be considered as essential for the ongoing viability and proliferation of a cell or tissue. However, since the first report in 2000 of an inactivating mutation in the TCA cycle enzyme complex, succinate dehydrogenase (SDH) in paraganglioma (PGL)¹, it has become clear that some cells and tissues are not only able to survive with a truncated TCA cycle, but they are also able to support the cell growth and proliferation phenotype observed in tumours. In order to investigate how loss of SDH activity is compatible with cell survival and proliferation, we performed a transcriptome-led analysis of the metabolic phenotype of *Sdhb*-deficient cells. We show that loss of SDH activity leads to changes in the metabolism of non-essential amino acids. In particular, we demonstrate that pyruvate carboxylase is essential to re-fill the depleted pool of aspartate in the TCA cycle of SDH-deficient cells. In addition, we show that SDH-deficient cells also use glutamine to produce key TCA cycle intermediates, but through reductive carboxylation rather than normal oxidative metabolism. In conclusion, our work demonstrates that the loss of SDH reduces the metabolic plasticity of cells, indicating vulnerabilities that can be targeted therapeutically.

Pheochromocytoma (PCC) and paraganglioma (PGL) are neuroendocrine tumours arising in the adrenal medulla and paraganglia of the autonomous nervous system, respectively. Since the original discovery of *SDHD* mutations in hereditary paraganglioma in 2000, the genes encoding all four proteins that make up the SDH complex as well as the required assembly factor (SDH assembly factor 2: *SDHAF2*) have been shown as tumour suppressor genes in familial and apparently sporadic PCC and PGL¹⁻⁵. The effects of these mutations are to abolish SDH activity, which results in high steady-state intracellular concentrations of succinate^{3,4,6-9}. This TCA cycle intermediate is now thought of as an oncometabolite, acting in part through the aberrant activation of transcription factors and global epigenetic reprogramming^{9,10}. However, the direct metabolic consequences of SDH loss are as yet uncharacterised. It was recently shown that loss of another TCA cycle enzyme associated with a hereditary cancer syndrome, fumarate hydratase (FH), led to significant metabolic reprogramming, some of which was essential for continued cell viability^{11,12}. This suggested that certain cell types are capable of re-wiring their metabolic network in response to the loss

of a fully functional TCA cycle and that the resulting metabolic phenotype is capable of sustaining oncogenic transformation.

In order to identify whether SDH-deficient tumours demonstrate a concerted transcriptional shift to support an altered metabolic profile, we performed a bioinformatic analysis of the transcriptome of 186 PCC/PGL (including 23 *SDH*-mutated tumours) using a previously described subset of metabolic genes identified as being important in tumourigenesis¹³. This analysis did indeed segregate *SDH*-mutated from non-*SDH* related tumours, suggesting that they exhibit a distinct metabolic phenotype (Supplementary Fig.1 and Supplementary Table 1). Gene ontology (GO) analysis of the differentially regulated pathways suggested that the most highly dysregulated metabolic pathways involved amino acid metabolism, with specific reference to the non-essential amino acids alanine, aspartate and glutamate, arginine and proline (Supplementary Table 1). We therefore investigated changes in amino acid metabolism using stable isotope (¹³C)-labelled glucose and glutamine, major carbon sources used to synthesise many of the non-essential amino acids in wild-type cells. As cell models for this analysis we used the previously described immortalised mouse chromaffin (imCC) cell lines (*Sdhb*^{-/-} [referred to as KO] c6 and c8)¹⁰, which represent the cell type from which PCC arise, and a novel *Sdhb*^{-/-} (mouse adrenal fibroblast (MAF) cell line model (Supplementary Fig. 2a-c). Analysis of the metabolites into which ¹³C had been incorporated from ¹³C-[1,2]-glucose showed increased label incorporation in intracellular serine and alanine pools, as well as in the glycolytic product, lactate (Fig. 1a). These changes were mirrored in the evolution of labelled pyruvate, lactate and alanine in the medium (Supplementary Fig. 2d). It is worth noting that the increased lactate production observed in the *Sdhb* KO cells is consistent with the pseudohypoxia-induced glycolytic phenotype previously reported^{9,14}.

The increased label incorporation observed in serine was associated with a significant upregulated expression of metabolic enzymes implicated in serine and glycine metabolism, together with increased glycine concentrations in SDH-deficient cells and tumours suggesting increased pathway use in response to loss of SDH activity (Fig. 1b and c and Supplementary Table 1). Interestingly, the most highly upregulated metabolic enzyme in this pathway, serine hydroxymethyltransferase (SHMT2), is an enzyme that promotes the metabolism of serine to glycine and supplies methyl groups for 1-carbon metabolism, epigenetic methylation events and other metabolic processes. Although the GO analysis also highlighted 1-carbon metabolism as being differentially regulated in SDH-mutated tumours (Supplementary Table 1), the increased availability of methyl groups for epigenetic modification is of particular interest given the hypermethylator phenotype of these tumours¹⁰.

In addition to being transaminated to form alanine, pyruvate can enter the mitochondria to be metabolised to aspartate and glutamate. Both these non-essential amino acids are key metabolic hubs for cell growth and proliferation due to their major role in providing carbon and nitrogen for anabolic metabolism. We observed significant flux of metabolites from pyruvate through the TCA cycle in both wild-type and *Sdhb* KO cells, through the detection of label incorporation from glucose into succinate, glutamate and aspartate (Fig. 1d). However, the isotopomers of glutamate and aspartate produced in the *Sdhb* wild-type and KO were significantly different suggesting differential use of metabolic pathways (Fig. 1d). Mitochondrial pyruvate can either be oxidatively decarboxylated by pyruvate dehydrogenase (PDH) to form acetyl coA, or carboxylated by pyruvate carboxylase (PC) to form OAA. In wild-type cells, the ^{13}C -[4,5]-glutamate species was the major isotopomer observed, consistent with the oxidative decarboxylation of pyruvate by PDH (Fig. 1d and e). However, in *Sdhb* KO cells, this was replaced by ^{13}C -[2,3]-glutamate, which was synthesised from labelled OAA (Fig. 1d and f). This indicates that in SDH-deficient cells there is an increase in the use of OAA synthesis and metabolism through the activity of PC, thereby providing necessary carbons for mitochondrial metabolism in a process known as anaplerosis. Through this mechanism, SDH-deficient cells can back-fill the TCA cycle to support cellular anabolism. One such anabolic product, aspartate, confirmed this activity. In wild-type cells ^{13}C -[1,2]/[3,4]-aspartate was synthesised through oxidative TCA cycle activity, while SDH-deficient cells showed a significant induction of PC activity to synthesise ^{13}C -[2,3]-aspartate from mitochondrial OAA (Fig. 1d-f). Indeed, we observed a switch from PDH to PC expression, illustrated by an increase in the *Pcx*/*Pdha1* mRNA ratio in SDH-deficient cells (Fig. 2a) as well as an upregulation of the mitochondrial glutamic-OAA transaminase (*Got2*), required to produce aspartate (Supplementary Fig. 3a). Accordingly, the contribution of PC activity to the total aspartate pool was significantly increased in SDH-deficient cells (Supplementary Fig. 2e). As the sole source of mitochondrial OAA in SDH-deficient cells is through the activity of PC, we hypothesised that this metabolite may be limiting for the synthesis of citrate in SDH-deficient cells, resulting in the accumulation of excess mitochondrial acetyl-coA. We therefore examined isotope incorporation into acetate, a ketone body product of acetyl-coA produced when it is in excess. We found that SDH-deficient cells synthesise significantly more $^{13}\text{C}_2$ -acetate from ^{13}C -[1,2]-glucose than wild-type cells (Supplementary Fig. 2f), suggesting that *Sdhb*-deficient cells and perhaps tumours may exhibit a ketogenic phenotype.

The increased reliance of SDH-deficient cells on PC activity for aspartate synthesis, and the central role of aspartate in cellular anabolism, suggested that loss of PC activity would be incompatible with cell growth and proliferation. First, we performed immunohistochemical

analyses of PC protein expression in both *Sdhb*-KO imCC (Fig. 2a) and human PCC/PGL tumour tissues with, or without *SDH* gene mutations (Fig. 2b). In both cases, we found that SDH-deficiency was associated with a significant upregulation of PC expression. We therefore tested whether SDH-deficient cells were dependent on PC activity by knocking down its expression in the imCC cell model using two independent siRNA sequences. Significant knockdown of the protein was achieved (Supplementary Fig. 3b), and resulted in reduced cell number in SDH-deficient cells while having no effect on WT cells (Fig. 2c and Supplementary Fig. 3c). This therefore confirmed the essential role of PC in SDH-deficient cell growth and proliferation.

In order to be available for cytosolic biosynthetic processes, aspartate produced in the mitochondria must be exported across the mitochondrial inner membrane against a gradient of glutamate using an aspartate-glutamate antiporter. Although expression of neither of the two antiporters, SLC25A12 and 13, was increased in SDH-deficient cells (Fig. 2d and Supplementary Fig. 3d), protein expression of SLC25A13 was noted as significantly upregulated in SDH-deficient tumours (Fig. 2e and Supplementary Table 2). We therefore investigated whether SDH-deficient cells were dependent on the activity of this transporter by treating them with the glutamate-aspartate antiporter inhibitor, diethylpyrocarbonate (DEPC). We found that, in agreement with the reduction in growth observed in cells with PC knock-down, the proliferation of SDH-deficient cells was greatly diminished by DEPC while little effect was observed on the wild-type cells (Fig. 2f). This confirmed the model in which SDH-deficient cells rely on the production of aspartate from PC-derived OAA in the mitochondria, and therefore require activity of the appropriate transporters to export it for biosynthetic use in the cytosol. As our cell line models were grown in DMEM, which lacks aspartate, the cells are entirely reliant on endogenous synthesis of aspartate for their growth and proliferation. We hypothesised that, if available, SDH-deficient cells would take up more exogenous aspartate than their wild-type counterparts. We therefore supplemented both wild-type and KO cells with exogenous $^{13}\text{C}_4$ -aspartate and found that cells lacking SDH activity demonstrated increased uptake and metabolism of this amino acid (Fig. 2g and Supplementary Fig. 3e), suggesting that in the absence of SDH activity, cells become effectively auxotrophic for aspartate and therefore asparagine and arginine (which are dependent on aspartate for their synthesis).

Having shown that SDH-deficient cells display significantly increased synthesis of aspartate from glucose using PC activity, and that they take up more exogenous aspartate, we wished to investigate why glutamine was unable to compensate for the putative deficiency in cytosolic aspartate. Glutamine is not only an amino acid, but also a major source of carbon, the availability of which is essential for *de novo* nucleotide biosynthesis and important for the

synthesis of almost all non-essential amino acids. We incubated both wild-type and *Sdhb*-deficient imCCs with $^{13}\text{C}_5$ -glutamine and the resulting polar extracts of cells and media were analysed for the incorporation of ^{13}C into metabolites. Significant concentrations of isotopomers of both aspartate and malate were detected in wild-type imCC cells ($^{13}\text{C}_4$, ^{13}C -[1,2] and ^{13}C -[3,4]-malate and aspartate; Fig. 3a), consistent with oxidative TCA cycle metabolism of glutamine through fumarate and succinate (Fig. 3b). As expected, due to the truncated TCA cycle, neither oxidatively produced metabolites were observed in SDH-deficient cells (Fig. 3a). ^{13}C -[1,2,3]/[2,3,4]-malate and aspartate isotopomers were also noted in wild-type cells, but not *Sdhb* KO clones (Fig. 3a). These isotopomers are likely the products of the reductive carboxylation of glutamine – an observation that is supported by the isotopomers of lactate identified in the same samples (Fig. 3c and Supplementary Fig. 4a). Interestingly, although label incorporation was observed in neither malate nor aspartate in SDH-deficient cells, evidence of reductive carboxylation of glutamine could be observed from the only isotopomer of lactate identified in these cells (^{13}C -[2,3], Fig. 3c, d and Supplementary Fig. 4a).

Investigation into the incorporation of ^{13}C from glutamine into succinate in *Sdhb* KO cells indicated that they synthesised significantly higher concentrations of fully-labelled ($^{13}\text{C}_4$) succinate from $^{13}\text{C}_5$ -glutamine than the wild-type cells – the build-up due to the loss of SDH activity (Fig. 3c and Supplementary Fig. 4a). However in addition to this succinate isotopomer, almost 2-fold higher concentrations of partially labelled ^{13}C -[1,2]/[3,4]-succinate were detected (Fig. 3c). This was consistent with the use of reductive carboxylation of glutamine in these cells. We hypothesised that the partially labelled isotopomers of succinate produced from glutamine carbons in these cells were the product of reductively synthesised pyruvate. This was supported by the increased production of ^{13}C -[1,2]-acetate from glutamine (Supplementary Fig. 4b), as was also observed from ^{13}C -labelled glucose (Supplementary Fig. 2f). The transcriptomic signature of SDH-deficient cells suggested that cytosolic reductive carboxylation of glutamine was supported by a concerted transcriptional response, resulting in the increase in labelled acetate and partially-labelled succinate (Fig. 3c, e and Supplementary Fig 4b). This species of succinate is unlikely to be a product of the metabolites preceding OAA in the reductive pathway, as direct import of alpha-ketoglutarate, isocitrate or citrate synthesised from $^{13}\text{C}_5$ -glutamine into the mitochondria would result in fully-labelled succinate (Supplementary Fig. 4c). The synthesis of ^{13}C -[1,2]/[3,4]-succinate in significant quantities therefore suggested increased ATP citrate lyase (ACLY) activity in the cytosol, which would produce partially-labelled OAA (Fig. 3d and e). We therefore suggest that SDH-deficient cells use glutamine-derived glutamate to support anabolism mainly through promoting the export of mitochondrial aspartate and reductive carboxylation (Fig. 4).

Metabolic reprogramming has been proposed to be a core hallmark of cancer¹⁵. SDH-mutated tumours by originating from a defect in a central mitochondrial enzyme complex constitute a genetic model for deciphering how metabolic adaptation fuels cell growth and proliferation. It has long been known that SDH-deficient PCC/PGL demonstrate an altered metabolic phenotype: not only through the inactivation of SDH mitochondria function *per se*, but also via a pseudohypoxic phenotype mediated by the effect of succinate accumulation on the cellular transcriptome. However, the details of this metabolic transformation were as yet uncharacterised. Our transcriptomic and metabolic tracer studies demonstrate that amino acid metabolism is altered in SDH-deficient cells as a result of re-wiring of mitochondrial metabolic pathways (Fig. 4). We have demonstrated that SDH-deficient cells increase their use of PC-dependent carboxylation of pyruvate to synthesise OAA in order to produce both aspartate and citrate in the mitochondria. However, the flux through this enzyme appears insufficient to cope with cellular requirements for these metabolic intermediates, as continuing oxidative metabolism of pyruvate to acetyl-coA results in ketogenesis. This would not only affect the bioenergetics of the surrounding tissue, but also would contribute to the acidification of the microenvironment of the tumour. In addition, SDH-deficient cells are apparently highly dependent upon mitochondrial aspartate production from OAA, as disruption of either synthesis or export to the cytosol resulted in significant loss of proliferation. Aspartate being a major precursor for protein and nucleotide biosynthesis may therefore constitute a metabolic hub that can determine the anabolic and proliferative state of the cell. In parallel, SDH-deficient cells and tumours show activation of the serine/glycine biosynthetic pathway, which may also be critical for proliferation¹⁶. Finally, we show that glutamine and glutamate are used to re-supply metabolic intermediates that would otherwise be lacking due to the truncation of the TCA cycle. Altogether, our data indicate a significant loss of metabolic plasticity in SDH-deficient cells, and suggest novel therapeutic targets that would likely specifically disrupt metabolism of these tumours.

Methods

Generation of mouse adrenal fibroblast cell lines

Mouse adrenal fibroblast cells (MAF) were isolated from the adrenal gland of *Sdhb*^{lox/lox} mice as described elsewhere¹⁰. All studies were performed in accordance with the relevant guidelines of the French Ministry of Agriculture (Authorization Executive Order A751532) for scientific experimentation on animals, European Communities Council Directive, and international ethical standards. Cells were infected with 10⁷ PFU/mL of an adenovirus expressing Cre-recombinase (Ad5CMV-Cre, CellBioLabs). A clonal approach by limiting dilution cloning assay was used to obtain homogenous *Sdhb*^{-/-} (KO) and *Sdhb*^{lox/lox} (referred to as WT) MAF clones.

Cell culture

Immortalized mouse chromaffin cells (imCC)¹⁰ and MAF were cultured in DMEM, high glucose, GlutaMAX supplement, pyruvate medium (GIBCO) supplemented with 10% foetal bovine serum (GIBCO) and maintained in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C.

¹³C-glucose, ¹³C-aspartate and ¹³C-glutamine labelling experiments

Cells (6×10^6) were plated onto two 15cm dishes and cultured in standard medium for 24 h. Cells were washed in PBS and the medium was then replaced by either fresh DMEM (no glucose) with 1mM sodium pyruvate and 10mM ¹³C₂-[1,2]-D-glucose (Sigma) or DMEM (high glucose with pyruvate, no glutamine) supplemented with 2mM ¹³C₅-L-glutamine (Sigma) for 24h. For aspartate labelling, cells were cultured in standard medium supplemented with 0.1mM ¹³C₄-L-aspartate for 48h.

Extraction of intracellular polar metabolites

Cells were washed with ice-cold PBS and scraped in a pre-cooled acetonitrile-methanol-water (55:35:10) solution. The cell lysates were vortexed for 15 min at 4 °C and immediately centrifuged at 15,000g for 15 min at 0 °C. The supernatants were finally evaporated using a SpeedVac concentrator and stored at -80°C until further analyses. For the metabolomic extraction of conditioned media, 600µl of an acetonitrile-methanol (60:40) solution was added to 200 µl of cell media, and then processed as described above. Dried NMR samples were resuspended in 60µL 100mM sodium phosphate buffer containing 500µM TMSP [(3-trimethylsilyl)propionic-(2,2,3,3-d₄)-acid sodium salt] and 10% D₂O, pH 7.0. Samples were vortexed, sonicated (5-15mins) and centrifuged briefly (x2), before transferred to 1.7mm NMR tubes using an automatic Gilson.

NMR spectroscopy

1D-¹H-NMR spectra and 2D-¹H,¹³C-HSQC NMR spectra were acquired using a 600 MHz Bruker Avance III spectrometer (Bruker Biospin, UK) with a TCI 1.7 mm z-PFG cryogenic probe at 300K. For all spectra, the spectral widths were set to 7,812.5 Hz and 24,155 Hz for the ¹H and ¹³C dimension respectively. 2,048 complex data points were acquired for the 1D-spectra, where spectra were ¹³C decoupled during acquisition using an adiabatic bilevel decoupling scheme. 512 complex data points were acquired for the ¹H dimension of 2D-¹H,¹³C-HSQC NMR spectra. An exponentially weighted non-uniform sampling scheme was used for the indirect dimension. Here, 30% of 8,192 complex data points (2,458) were acquired. 32 transients were recorded for the 1D-NMR spectra with a relaxation delay of 4 sec, and 2 transients were recorded for the 2D-¹H,¹³C-HSQC NMR spectra with a relaxation delay of 1.5 sec. Each sample was automatically tuned, matched and then shimmed (1D-TopShim) to a TMSP line width of < 2 Hz prior to acquisition of the first spectrum. Total experiment time was approximately 10 mins per sample for 1D-¹H-NMR spectra and 4.5 h per sample for 2D-¹H,¹³C-HSQC NMR spectra. 1D-¹H-NMR spectra were processed using the MATLAB-based MetaboLab software¹⁷. All 1D data sets were zero-filled to 131,072 data points prior to Fourier Transformation. The chemical shift was calibrated by referencing the TMSP signal to 0 ppm. 1D-spectra were manually phase corrected. Baseline correction was achieved using a spline function¹⁷. 1D-¹H-NMR spectra were exported into Bruker format for metabolite identification and concentration determination using Chenomx 7.0

(ChenomxINC). 2D- ^1H , ^{13}C -HSQC NMR spectra were reconstructed using compressed sensing in the MDDNMR and NMRpipe software¹⁸⁻²⁰. The final spectrum size was 1,024 real data points for the ^1H dimension and 16,384 real data points for the ^{13}C dimension. Analysis was performed using MetaboLab and pyGamma software was used in multiplet simulations²¹. The methyl group of lactate was used to calibrate the chemical shift based on its assignment in the human metabolome database²².

siRNA experiments

50.000 cells were transfected with 320ng of Silencer Select Pre-designed siRNA against PC (siRNA references s71354 & s71355; Life Technologies) or Silencer Select negative control using HiPerfect reagent (Qiagen) as described by the manufacturer and plated onto 6-well plates for further culture in standard conditions. Efficiency of gene extinction was evaluated 48h post-transfection by immunofluorescence. Cells were retransfected every 48h to maintain long-term extinction.

DEPC treatment

50.000 cells were plated on 6-well plates and treated with 100 μM 200 μM diethylpyrocarbonate (*DEPC*) to inhibit the aspartate/glutamate antiporter. Medium was replaced every day.

Immunofluorescence

Cells plated on glass coverslips (Thermo scientific) were washed in PBS and fixed for 20min in ice-cold paraformaldehyde 4% and permeabilized/blocked in 1% BSA, 0.1% Triton for 30min. Primary antibody (anti-PCB antibody [3H2AD9] (abcam, ab110314), 1:100) was incubated overnight at 4°C. Secondary antibodies (Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG (1/2000, Invitrogen) were incubated for 1h, at room temperature in the dark. Slides were mounted in Vectashield, containing DAPI and acquisitions were performed using Axiomager Z1 Zeiss, with apotome system.

Cell proliferation

50.000 cells were plated on 6-well plates, transfected as described and passed before reaching confluence into 10 cm dishes. Growth curves were established by counting cells every 48h after transfection for 8 days.

Organic acid assays

Eight snap-frozen tumour samples (1 *SDHD*, 3 *SDHB*, 3 *NF1* and 1 *MAX*-mutated) and six imCC samples (3 WT, 3 KO) were processed by organic extraction with ethylacetate, derivatization with N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide with 1% trimethylchlorosilane, and analysed by gas chromatography-tandem mass spectrometry on a GC-MS triple quadrupole (Scion TQ, Brüker Daltonics). Analytes were identified according to retention time and mass spectrum in selected reaction monitoring mode based on standard spectral reference libraries.

Tumour samples

Tumours were collected prospectively by the French 'Cortico et Médullosurrénale: les Tumeurs Endocrines' (COMETE) network. Ethical approval for the study was obtained from the institutional review board [Comité de Protection des Personnes (CPP) Ile de France III, June 2012].

Written informed consent for the sample collection and subsequent analyses was obtained from all patients. The procedures used for PCC/PGL diagnosis were in accordance with both internal and international clinical practice guidelines^{23,24}. Diagnosis was confirmed by histology in every case. A total of 202 consecutive cases of PCC/PGL, recruited over 15 years (1993-2008), were included in this study. Fresh tumour samples collected during surgery were immediately frozen and stored in liquid nitrogen until processing. Formalin-fixed paraffin-embedded tissues were used for immunohistochemical analyses.

Gene expression data

Gene expression profiles of human tumours were available from a previous study, in which 186 PCC/PGL were analyzed²⁵. All the samples were genotyped for the presence or the absence of germline and somatic mutations in well-known PCC/PGL susceptibility genes. In total there are 23 SDHx, 38 VHL, 30 NF1, 14 RET, 1 TMEM127, 3 MAXs, 6 HRAS, 3 MET, 65 sporadic, 1 NF1/MET, 1 RET/HRAS and 1 TP53/CDKN2A/MET²⁶. HG-U133 Plus 2.0 Affymetrix GeneChip data from this previous study are available online as ArrayExpress entry E-MTAB-733 (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>).

Gene expression profiles of wild-type and *Sdhb*^{-/-} MAF, imCC c6 and imCC c8 were assessed in duplicates using the GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Array.

DNA methylation arrays

Whole genome DNA methylation was analyzed in 145 tumour samples using the Illumina Infinium HumanMethylation27 assay as previously reported¹⁰. Data from this previous study are accessible through the NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO) series accession number [GSE43298](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>).

Immunohistochemistry

6 µm sections were cut from 27 paraffin-embedded tumour samples (Supplementary Table 2) and mounted on Superfrost plus slides. The following antibodies and a standard procedure were used for immunohistochemistry²⁷ with Histogreen as a chromogen: anti-PC (1:100, ab115579, abcam), anti-SCL25A13 (1:50, abcam). Antigen retrieval was performed by boiling slides in Tris-EDTA buffer (pH9) for 45 min for PC and in citrate buffer (pH6) for SCL25A13. Images were acquired with a Leica DM400B microscope with Leica Application Suite software version 2.8.1, and a Leica DFC420C camera.

References

- 1 Baysal, B. E. *et al.* Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science* **287**, 848-851 (2000).
- 2 Astuti, D. *et al.* Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma. *Am J Hum Genet* **69**, 49-54, (2001).
- 3 Burnichon, N. *et al.* SDHA is a tumor suppressor gene causing paraganglioma. *Hum Mol Genet* **19**, 3011-3020, (2010).
- 4 Hao, H. X. *et al.* SDH5, a gene required for flavination of succinate dehydrogenase, is mutated in paraganglioma. *Science* **325**, 1139-1142, (2009).
- 5 Niemann, S. & Muller, U. Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3. *Nat Genet* **26**, 268-270, (2000).
- 6 Gimenez-Roqueplo, A. P. *et al.* The R22X mutation of the SDHD gene in hereditary paraganglioma abolishes the enzymatic activity of complex II in the mitochondrial respiratory chain and activates the hypoxia pathway. *Am J Hum Genet* **69**, 1186-1197, (2001).
- 7 Gimenez-Roqueplo, A. P. *et al.* Functional consequences of a SDHB gene mutation in an apparently sporadic pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 4771-4774, (2002).
- 8 Douwes Dekker, P. B. *et al.* SDHD mutations in head and neck paragangliomas result in destabilization of complex II in the mitochondrial respiratory chain with loss of enzymatic activity and abnormal mitochondrial morphology. *The Journal of pathology* **201**, 480-486, (2003).
- 9 Selak, M. A. *et al.* Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer cell* **7**, 77-85, (2005).
- 10 Letouze, E. *et al.* SDH mutations establish a hypermethylator phenotype in paraganglioma. *Cancer cell* **23**, 739-752, (2013).
- 11 Frezza, C. *et al.* Haem oxygenase is synthetically lethal with the tumour suppressor fumarate hydratase. *Nature* **477**, 225-228, (2011).
- 12 Zheng, L. *et al.* Reversed argininosuccinate lyase activity in fumarate hydratase-deficient cancer cells. *Cancer & metabolism* **1**, 12, (2013).
- 13 Possemato, R. *et al.* Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature* **476**, 346-350, (2011).
- 14 Briere, J. J. *et al.* Mitochondrial succinate is instrumental for HIF1 α nuclear translocation in SDHA-mutant fibroblasts under normoxic conditions. *Hum Mol Genet* **14**, 3263-3269, (2005).
- 15 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674, (2011).
- 16 Jain, M. *et al.* Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. *Science* **336**, 1040-1044, (2012).
- 17 Ludwig, C. & Gunther, U. L. MetaboLab - advanced NMR data processing and analysis for metabolomics. *Bmc Bioinformatics* **12**, (2011).
- 18 Delaglio, F. *et al.* Nmrpipe - a Multidimensional Spectral Processing System Based on Unix Pipes. *J Biomol Nmr* **6**, 277-293, (1995).
- 19 Kazimierczuk, K. & Orekhov, V. Y. Accelerated NMR Spectroscopy by Using Compressed Sensing. *Angew Chem Int Edit* **50**, 5556-5559, (2011).
- 20 Orekhov, V. Y. & Jaravine, V. A. Analysis of non-uniformly sampled spectra with multi-dimensional decomposition. *Prog Nucl Mag Res Sp* **59**, 271-292, (2011).
- 21 Smith, S. A., Levante, T. O., Meier, B. H. & Ernst, R. R. Computer-Simulations in Magnetic-Resonance - an Object-Oriented Programming Approach. *J Magn Reson Ser A* **106**, 75-105, (1994).
- 22 Wishart, D. S. *et al.* HMDB: the human metabolome database. *Nucleic Acids Res* **35**, D521-D526, (2007).

- 23 Plouin, P. F., Gimenez-Roqueplo, A. P. & Bertagna, X. [COMETE, a network for the study and management of hypersecreting adrenal tumors]. *Bulletin de l'Académie nationale de médecine* **192**, 73-82; discussion 83-75 (2008).
- 24 Lenders, J. W. *et al.* Pheochromocytoma and paraganglioma: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* **99**, 1915-1942, (2014).
- 25 Burnichon, N. *et al.* Integrative genomic analysis reveals somatic mutations in pheochromocytoma and paraganglioma. *Hum Mol Genet* **20**, 3974-3985, (2011).
- 26 Castro-Vega, L. J. *et al.* Multi-omics analysis defines core genomic alterations in pheochromocytomas and paragangliomas. *Nature communications* **6**, 6044, (2015).
- 27 Favier, J., Kempf, H., Corvol, P. & Gasc, J. Cloning and expression pattern of EPAS1 in the chicken embryo. Colocalization with tyrosine hydroxylase. *FEBS letters* **462**, 19-24 (1999).

Acknowledgements

We thank Profs Pierre-François Plouin, Xavier Bertagna and Jérôme Bertherat for making this work possible through the COMETE Network. We also thank Eric Letouzé, Aurélien de Reyniès, Nabila Elarouci, Dr Rossella Libe, Prof Cécile Badoual, Dr Tchao Meatchi and Dr Frédérique Tissier for their help, Estelle Robidel and Maeva Ruel for technical assistance and Catherine Tritscher for administrative assistance. The work leading to these results has received funding from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-2011-JCJC-00701 MODEOMAPP), the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n° 259735 and the Plan Cancer: Appel à projets Epigénétique et Cancer 2013 (EPIG201303 METABEPIC). Non-uniformly sampled NMR spectra in this paper were reconstructed using the University of Birmingham's BlueBEAR HPC service, which provides a High Performance Computing service to the University's research community.

C.L-L. is funded by the Cancer Research for Personalized Medicine - CARPEM project (Site de Recherche Intégré sur le Cancer - SIRIC) an MM by "Le canceropôle Ile-de-France"(2013-2-AD-02-UP 5-1).

KERH is funded by a CASE award studentship by the BBSRC and AstraZeneca.

This work is part of the "Cartes d'Identité des Tumeurs (CIT) program" funded and developed by the 'Ligue Nationale contre le Cancer' (<http://cit.ligue-cancer.net>).

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

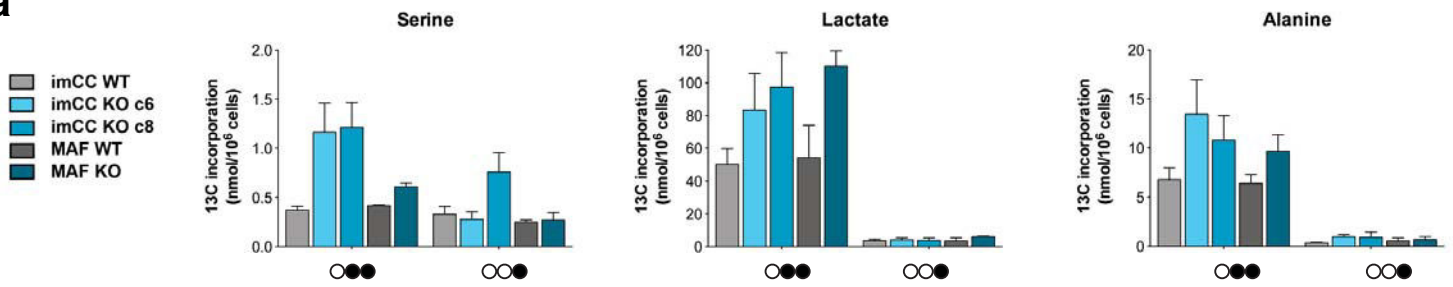
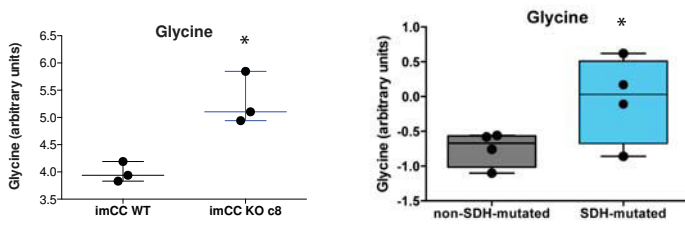
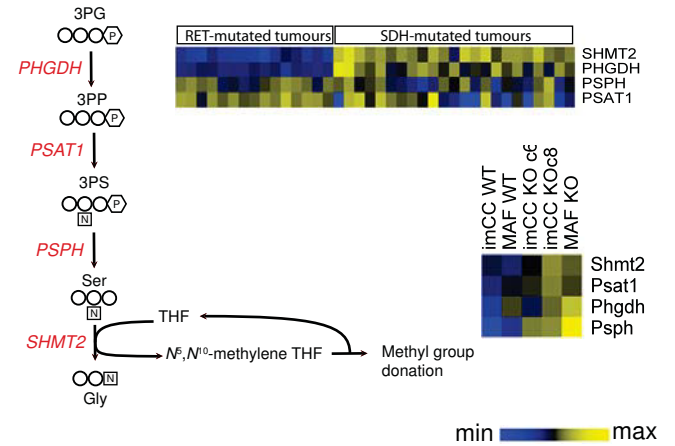
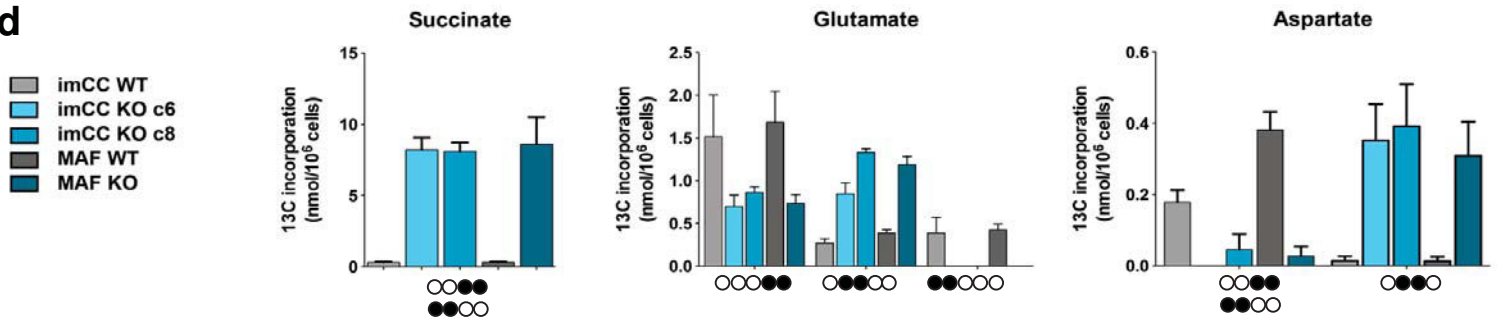
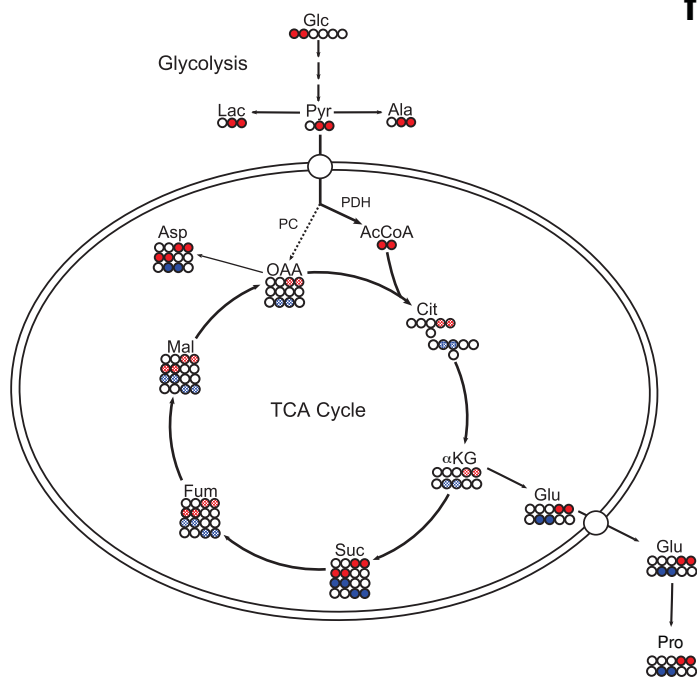
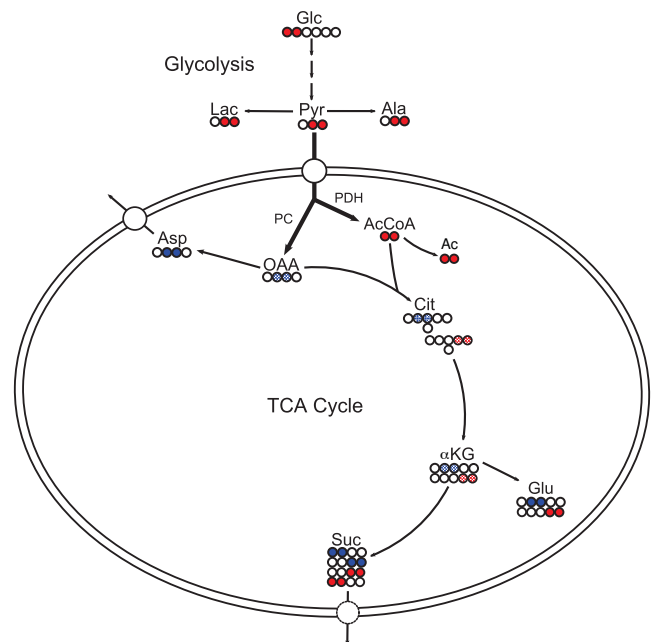
Figure Legends

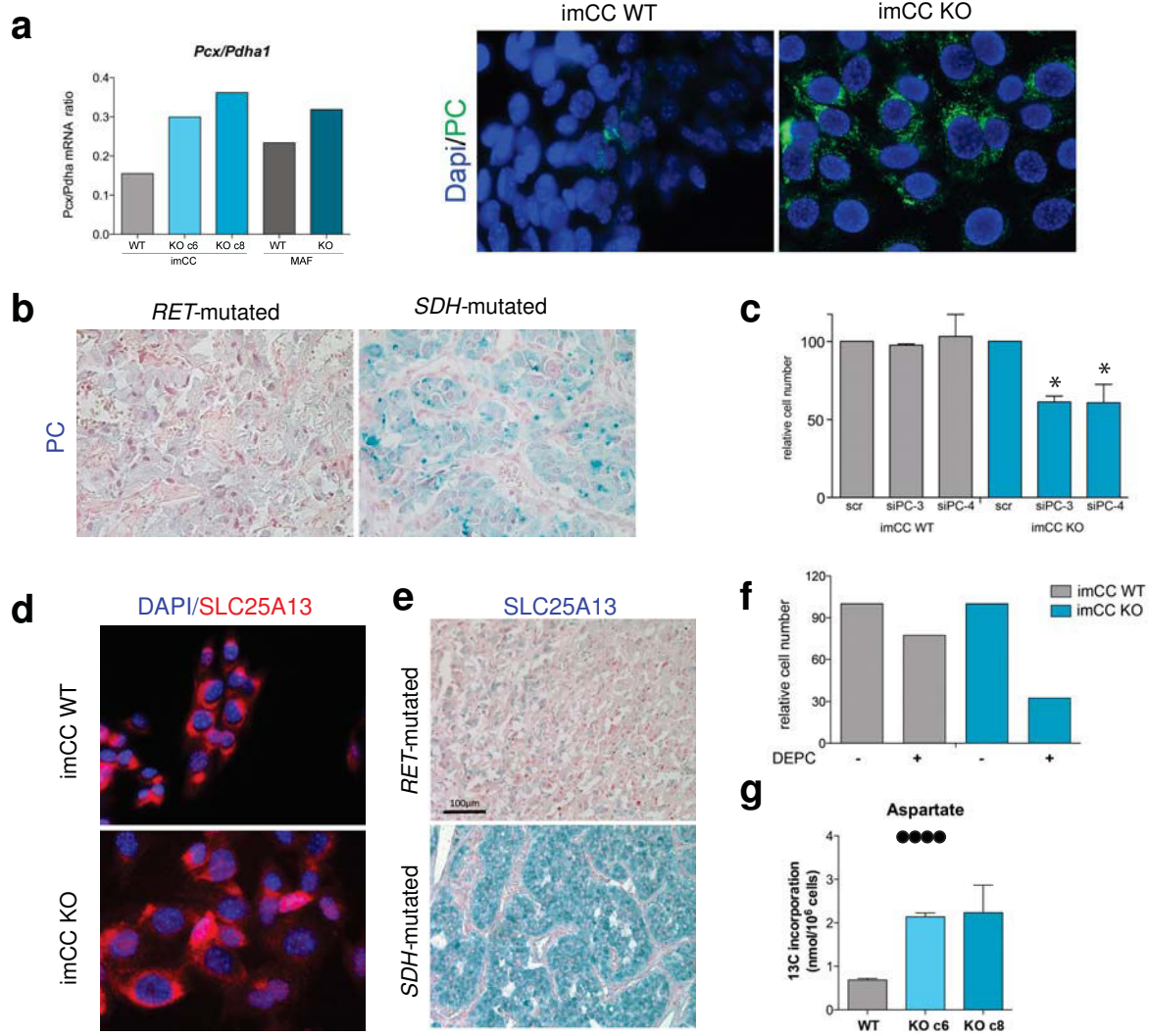
Figure 1: Glucose metabolism in SDH-deficient cells. Loss of succinate dehydrogenase function leads to perturbations in glucose metabolism, and a mitochondrial switch to pyruvate carboxylation. For all labelling cartoons shown below graphs, carbon numbering is from left to right. **a)** Incorporation of ^{13}C from ^{13}C -[1,2]-glucose into serine, lactate and alanine at the positions shown as black circles. ^{13}C -[2,3] of these metabolites is through direct glycolytic metabolism of glucose, which is increased in both SDH deficient imCC and MAF cell lines. **b)** Steady-state concentrations of glycine are increased in SDH-deficient imCC cells and tumours **c)** Enzymes involved in the serine/glycine synthetic pathway are upregulated in both SDH-deficient cells and tumours, supporting increased flux. **d)** ^{13}C incorporation from glucose into succinate is increased in SDH-deficient cells. While incorporation of ^{13}C into glutamate and aspartate in molecular positions consistent with pyruvate oxidation is decreased, the ^{13}C -[2,3]-glutamate and ^{13}C -[2,3]-aspartate isotopomers are increased due to enhanced PC activity. **e,f)** diagrams describing the incorporation of carbons from glucose through PDH (red) or PC (blue) activity into **e)** wild-type and **f)** *Sdhb*^{-/-} cells. Abbreviations in metabolic diagrams: αKG; alpha-ketoglutarate, 3PG; 3-phosphoglycerate, 3PP; 3-phosphopyruvate, 3PS; 3-phosphoserine, Ac; acetate, AcCoA; acetyl coenzyme A, Ala; alanine, Asp; aspartate, Cit; citrate, Fum; fumarate, Glc; glucose, Glu; glutamate, Gly; glycine, Lac; lactate, Mal; malate, OAA; oxaloacetate, PC; pyruvate carboxylase, PDH; pyruvate dehydrogenase, Pro; proline, Pyr; pyruvate, Ser; serine, Suc; succinate, THF; tetrahydrofolate.

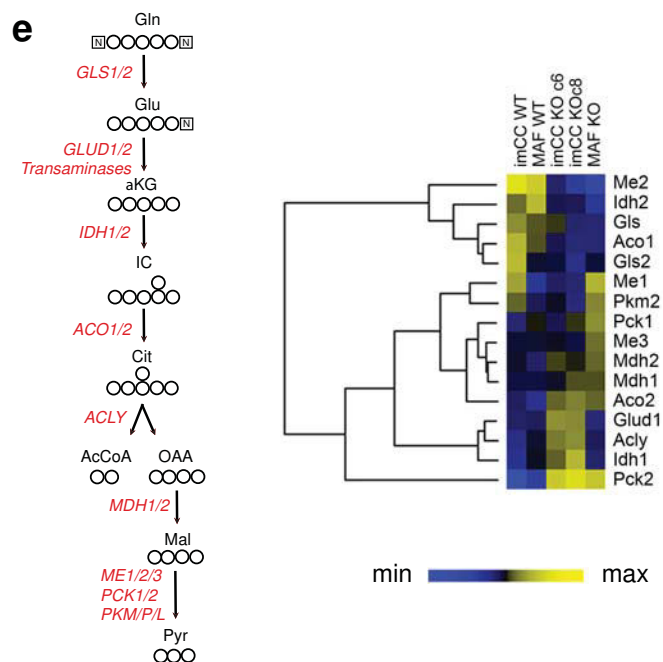
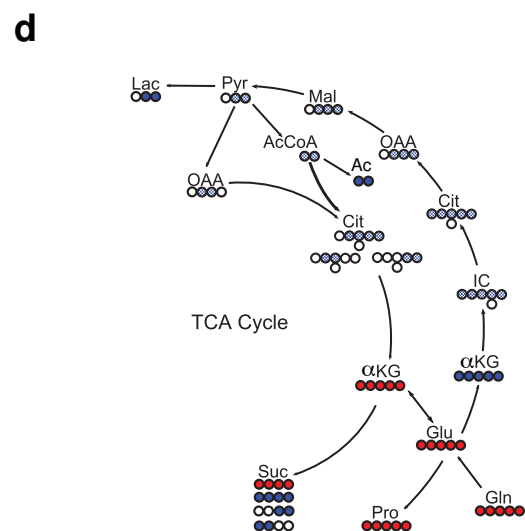
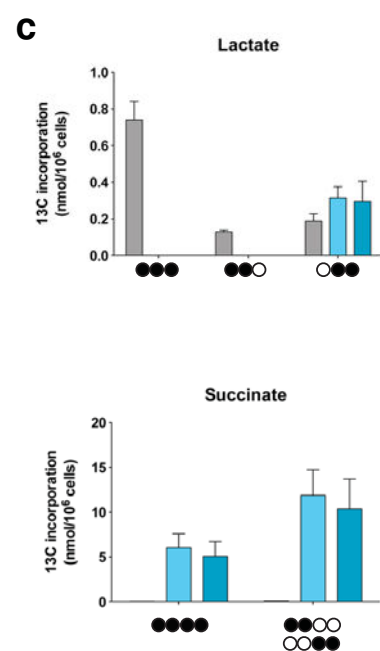
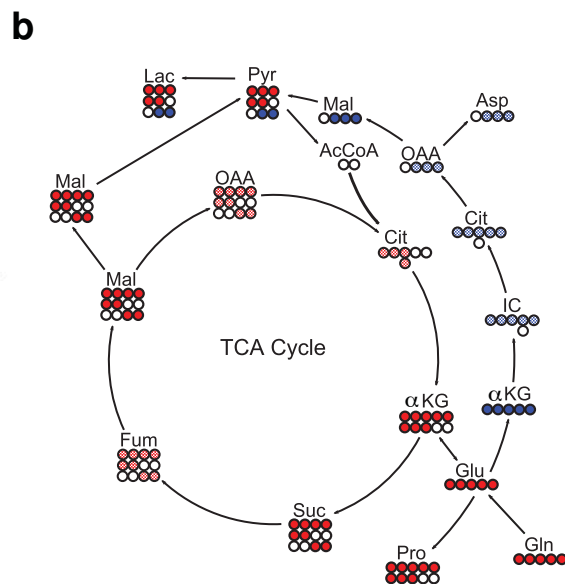
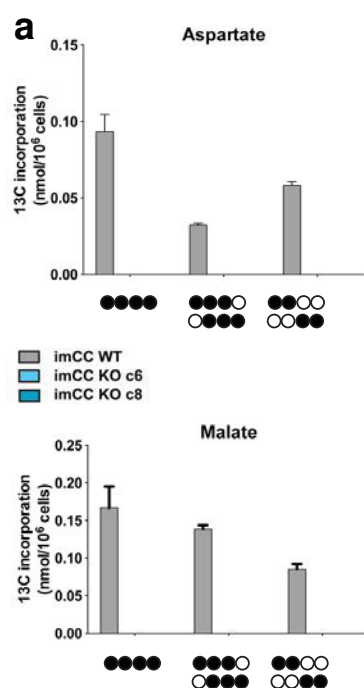
Figure 2: Mitochondrial aspartate synthesis by PC and export is essential for *Sdhb*^{-/-} cell proliferation. **a)** *Pcx/Pdha1* mRNA ratio is increased in *Sdhb*^{-/-} (KO) cells relative to wild-type (left), as is PC protein expression (right). **b)** *SDH*-mutated PCC also show significantly upregulated PC expression compared with non-*SDH*-mutated PCC harbouring a *RET* mutation. **c)** Knockdown of PC expression with two independent siRNAs result inhibition of proliferation only in *Sdhb*^{-/-} cells, while scrambled (scr) siRNA shows no effect. **d,e)** glutamate/aspartate antiporter SLC25A13 protein expression in **d)** *Sdhb*^{-/-} cells and **e)** *SDHB*-mutated PCC consistent with increased requirement for export of aspartate from the mitochondria. **f)** pharmacological inhibition of the glutamate/aspartate antiporter using DEPC results in inhibition of proliferation only in *Sdhb* KO cells. **g)** *Sdhb*^{-/-} imCC cells (clones c6 and c8) demonstrate increased uptake of aspartate compared with wild-type cells, consistent with an intracellular deficiency in this amino acid

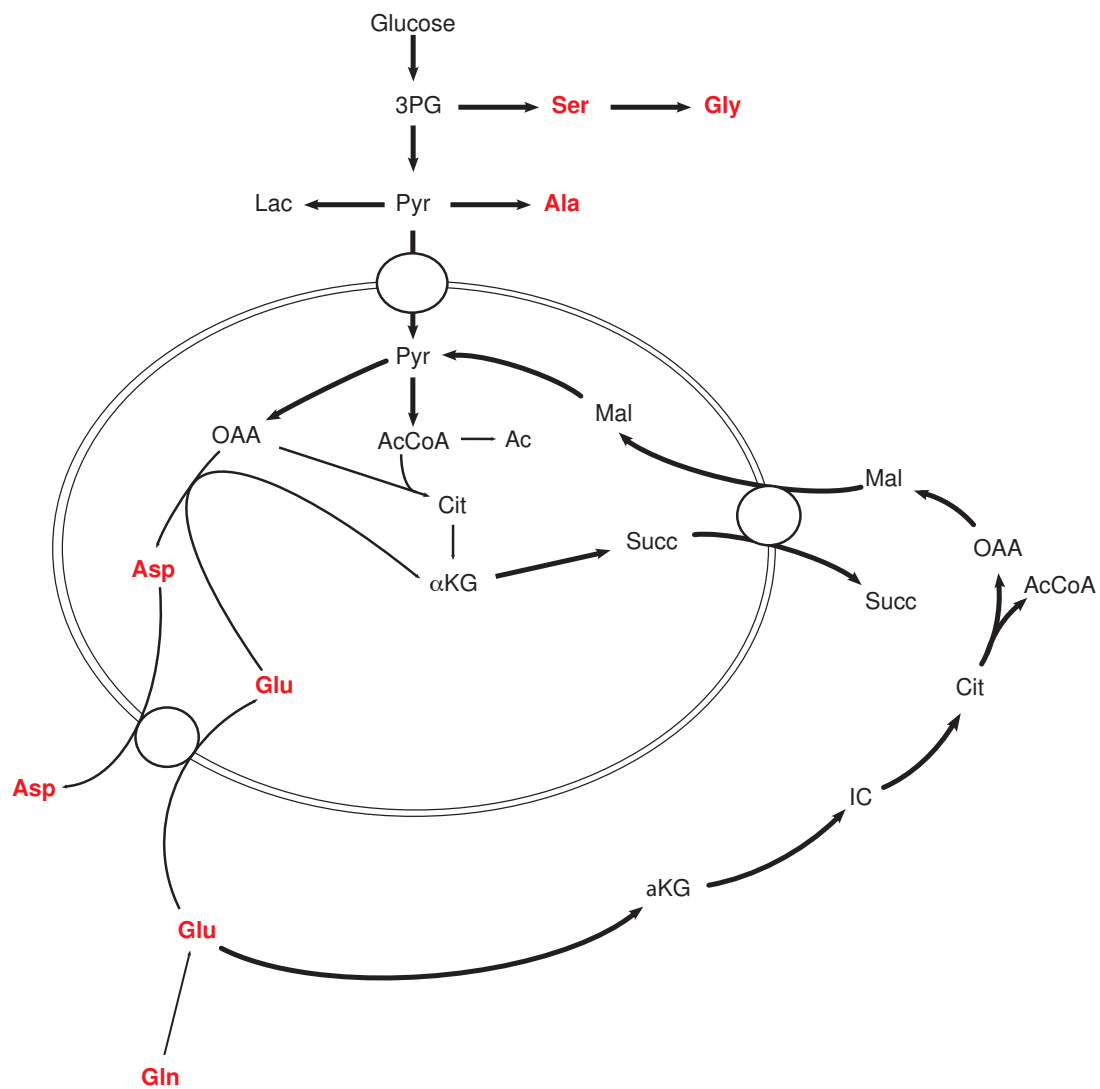
Figure 3: *Sdhb*^{-/-} cells exhibit dysfunctional glutamate metabolism leading to reductive carboxylation. **a)** wild-type cells metabolise glutamine into both aspartate (top panel) and malate (bottom panel). Isotopomers detected are consistent with both oxidative and reductive pathway use. No ¹³C incorporation from glutamine into either malate or aspartate was detected in *Sdhb*^{-/-} cells. **b)** A diagram showing the metabolism of glutamine in wild-type cells consistent with labelling data. **c)** Wild-type and *Sdhb*^{-/-} cells produce lactate from glutamine. As *Sdhb*^{-/-} cells cannot use oxidative TCA cycle, lactate produced is only through reductive carboxylation. Amount of ¹³C-lactate produced from glutamine is about 50-fold less than that produced from glucose (see Fig.1a). ¹³C from glutamine is not observed in wild-type cells, but is incorporated to form both ¹³C₄-succinate and ¹³C-[1,2]/[3,4]-succinate. **d)** A diagram showing reductive (blue) and oxidative metabolism (red) of glutamine by SDH-deficient cells. **e)** The enzymes involved in the reductive metabolism of glutamine are differentially expressed in SDH-deficient cells. Of interest, most enzymes with cytosolic reductive activity are upregulated, whereas most with mitochondrial-localised reductive activity are downregulated. Abbreviations in metabolic diagrams: αKG; alpha-ketoglutarate, Ac; acetate, AcCoA; acetyl coenzyme A, Ala; alanine, Asp; aspartate, Cit; citrate, Fum; fumarate, Gln; glutamine, Glu; glutamate, IC; isocitrate, Lac; lactate, Mal; malate, OAA; oxaloacetate, Pro; proline, Pyr; pyruvate, Suc; succinate.

Figure 4: Re-wiring of metabolism in SDH-deficient cells as elucidated from tracer studies using ¹³C labelled glucose and glutamine. Abbreviations: αKG; alpha-ketoglutarate, Ac; acetate, AcCoA; acetyl coenzyme A, Ala; alanine, Asp; aspartate, Cit; citrate, Fum; fumarate, Gln; glutamine, Glu; glutamate, IC; isocitrate, Lac; lactate, Mal; malate, OAA; oxaloacetate, Pro; proline, Pyr; pyruvate, Ser; serine, Succ; succinate.

a**b****c****d****e****f**







3.4 Résultats et discussion

Par cette étude, nous avons montré que la perte d'activité de la succinate déshydrogénase entraîne des changements métaboliques des acides aminés non essentiels. En particulier, nous avons montré l'importance de la pyruvate carboxylase pour recharger le pool d'aspartate via le cycle de Krebs, des cellules déficientes en SDH. L'aspartate est un précurseur important de la synthèse des protéines et des nucléotides, et pourrait également constituer un pool déterminant le statut anabolique et prolifératif des cellules. Par ailleurs, nous avons observé que ces cellules utilisent la glutamine pour produire des intermédiaires du Krebs, ceci par carboxylation réductive. Ces travaux ont démontré que la perte d'activité SDH réduit la plasticité métabolique des cellules, ceci indiquant par la même occasion des fragilités pouvant être d'intéressantes cibles thérapeutiques.

Les études de flux ont montré que la production d'aspartate à partir du pyruvate augmente, alors que la concentration absolue d'aspartate diminue à l'état stationnaire à la fois dans le modèle in vitro, et en moindre mesure, dans les tumeurs. Cela indique que dans la tumeur, il existe une consommation d'aspartate qui tend à être supérieure à la production, et cela malgré la surexpression des mécanismes qui sous-tendent cette production (pyruvate carboxylase et l'un des transporteurs mitochondriaux de l'aspartate, appelé citrine). Ces mécanismes sont donc compensatoires par rapport au déficit en SDH et représentent une cible thérapeutique antitumorale de choix, ce qui a été testé avec succès par nos collaborateurs par l'administration d'un inhibiteur du transport mitochondrial de l'aspartate.

4. Construction de bibliothèques spectrales pour l'analyse des acides organiques en GC tandem MS

4.1 Contexte et objectifs

L'étude des acides organiques est fondamentale pour le diagnostic de plus de 150 maladies héréditaires du métabolisme, et a un rôle de premier plan dans l'arsenal hospitalier, car ces maladies sont rares mais souvent sévères et pourtant traitables. Leur analyse est souvent réalisée manuellement, alors que le nombre de pics identifiables dans les urines est de plusieurs centaines pour chaque échantillon. D'autre part, la technique de choix est la GC-MS (mode de détection full-scan), qui permet une analyse non-ciblée avec une bonne spécificité dans l'urine, du fait de l'accumulation de nombreux acides organiques dans ce compartiment. Néanmoins, il est désormais question d'augmenter la spécificité et la sensibilité de la technique pour pouvoir l'appliquer à d'autres milieux biologiques, notamment le plasma ou le LCR, où les acides organiques sont pour la plupart beaucoup moins concentrés que dans l'urine. De plus, en recherche, certains extraits cellulaires ou

tissulaires sont traités uniquement au méthanol, et dans ce cas un grand nombre d'interférences peuvent apparaître dû à la richesse de l'extrait. D'autre part, l'effet des interférences devient inacceptable dans les études de flux métabolique, lorsque il est parfois nécessaire de chercher des accumulations de l'ordre de 5-10% pour des composés marqués aux isotopes stables.

En milieu hospitalier comme en recherche, on peut utiliser un mode dit SIM pour Single Ion Monitoring en anglais qui augmente la sensibilité de l'analyse car on fixe la détection sur un seul rapport m/z (masse/charge) d'un fragment du composé, mais la spécificité est la même que pour le full-scan. Ceci implique que les ions recherchés doivent être présents dans le composé d'intérêt à un temps de rétention donné, mais cela n'est jamais sûr, et le risque d'interférence avec d'autres composés n'est pas éliminé. Une solution pour augmenter la spécificité est la spectrométrie de masse en tandem.

Pour s'affranchir des interférences, une possibilité est d'effectuer une purification préalable des classes de métabolites d'intérêt en fonction de certaines de leurs caractéristiques chimiques. Cela a le désavantage, si on veut étudier plusieurs classes de métabolites, qu'il faut multiplier les techniques, avec une augmentation en termes de lourdeur du travail et en termes de variance technique dans les résultats. En revanche, la technique d'analyse en spectrométrie de masse en tandem n'a aucun de ces désavantages car elle s'applique à toute classe de métabolite et ne fait que rajouter une étape de fragmentation au sein de l'analyseur. Ceci permet ainsi d'utiliser l'information de deux spectres de masse au lieu d'un, avec en plus l'information apportée par le fait qu'un spectre génère l'autre (ions précurseurs donnant des ions produits à une énergie de collision déterminée). Le désavantage de la spectrométrie de masse en tandem est qu'elle nécessite un temps de « scan » plus long, ce qui pose une limite à la quantité de composés analysables à un temps de rétention donné. D'autre part, il s'agit d'une analyse nécessairement ciblée, c'est à dire confinée à un ensemble de composés définis à l'avance, et elle ne permettra pas d'identifier d'éventuels composés inattendus. Enfin, elle nécessite la mise au point de toutes les transitions à quantifier (les couples ion précurseur-ion produit), parce qu'il n'existe pas de bibliothèques spectrales de GC-tandem MS. Cette mise au point est donc lourde, mais elle doit être réalisée une fois pour toutes – contrairement aux techniques d'extraction/purification.

Je me suis ainsi attelé à la création d'une « bibliothèque spectrale » pour la GC-tandem MS dans son mode opératoire habituel (dérivation par silylation BSTFA/TMCS (annexe 5) et ionisation par impact électronique). Cette bibliothèque a été ciblée sur les composés les plus importants sur le plan de l'étude des maladies héréditaires du métabolisme. J'ai également commencé à développer des bibliothèques spectrales adaptées à des tests fonctionnels par charge en plusieurs traceurs (glutamine $^{13}\text{C}_5$, leucine $^{13}\text{C}_6$, palmitate $^{13}\text{C}_{16}$). Enfin, je présente ici le développement de la séparation chromatographique et l'analyse en tandem MS des deux stéréoisomères du 2-HG : le ratio des deux étant un très bon marqueur diagnostique et de

suivi des patients atteints de LAM avec mutation des gènes codant les isocitrate déshydrogénases.

4.2 Généralités sur la technique

Cette technique de spectrométrie en tandem consiste en la sélection au niveau du premier quadripôle d'un ion dit précurseur ou parent obtenu par impact électronique (IE) dans la source, puis en la sélection d'un ion produit ou fragment ou fils par le troisième quadripôle, après collision avec un gaz neutre qui est généralement l'argon au niveau de la chambre de collision (dite second quadripôle). On analyse donc ce qu'on appelle une transition dont il faut vérifier qu'elle est spécifique de ce composé.

Après optimisation de l'énergie de collision fragmentant plus ou moins l'ion précurseur, on obtient en général un pic unique correspondant à notre composé. Le signal n'est pas toujours supérieur à un signal en full scan, mais le rapport signal sur bruit est fortement amélioré. De plus, la spécificité de la transition permet un "nettoyage" du chromatogramme, ce qui aboutit à une meilleure lisibilité et surtout à une absence d'interférences comme c'est parfois le cas en mode full scan ou en SIM.

Voici un schéma reprenant cette technique :

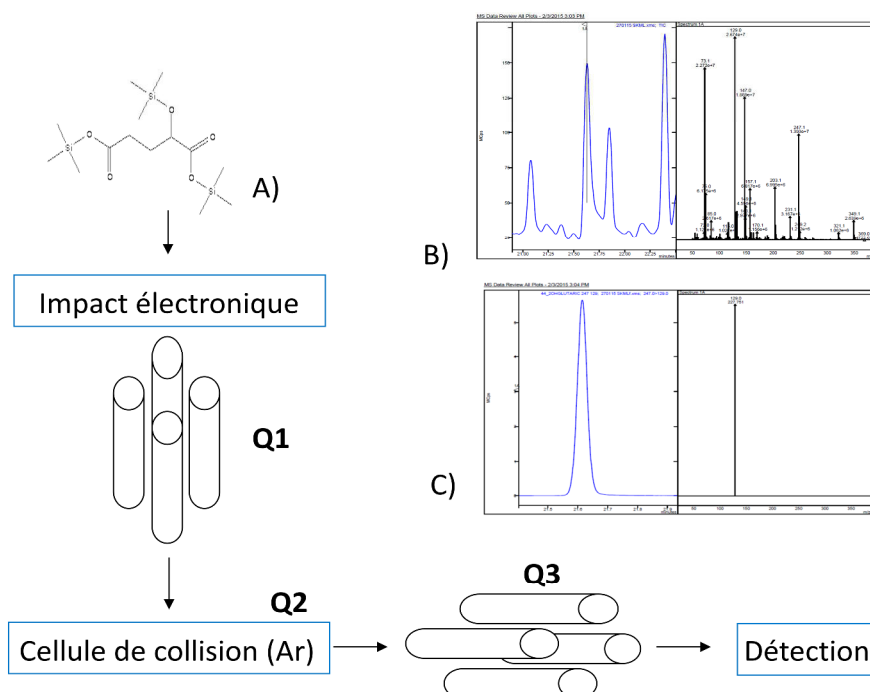


Figure 17 : Schéma explicatif de la spectrométrie de masse en tandem.

A) Molécule de 2-hydroxyglutarate 3TMS. Profil chromatographique (à gauche) et spectre de masse (à droite) du 2-hydroxyglutarate en full scan (B) et en MRM (tandem MS; C)). Q = quadripôle.

4.3. Matériel et Méthodes

Les bibliothèques spectrales sont des listes associant des composés à des transitions caractéristiques qui peuvent être utilisées par un logiciel dédié pour identifier et quantifier automatiquement les métabolites présents dans un échantillon. Ces données plus d'autres caractéristiques nécessaires à l'identification des composés (temps de rétention dans des conditions données, énergie de collision, fenêtre de résolution de masse etc.) sont directement implémentées dans des méthodes d'acquisition que l'on applique à tout échantillon. Pour déterminer les transitions de chaque composé d'intérêt, j'ai systématiquement re fragmenté certains des ions caractéristiques (générés par la source) ; identifié un ou plusieurs ions produits en examinant toutes les valeurs de m/z , mode product ion scan) ; sélectionné certains ions produits ; optimisé, si nécessaire, l'énergie de collision correspondante ; inséré les données résultantes dans la méthode globale qui permettra l'acquisition « intégrée » de tous les composés dans chaque échantillon.

Le matériel comprend les composés purifiés pour ceux dont des standards étaient disponibles dans le commerce, ou bien des échantillons biologiques dont on avait vérifié la présence des composés d'intérêt par GC-simple MS sur la base des bibliothèques spectrales habituelles (base NIST entre autre). Ainsi j'ai utilisé soit des produits purs soit une comparaison à la technique de référence en GC-MS. Pour obtenir des facteurs de réponse j'ai utilisé des gammes dérivées des solutions provenant des centres de contrôle qualité externe européen (ERNDIM).

Selon les recommandations de qualité pour la spectrométrie de masse, j'ai validé au moins deux transitions par composé, dont l'un sert de quantificateur et l'autre d'ion qualifiant.

Les listes des transitions sont données dans les tableaux en annexe 11.

En ce qui concerne les charges par traceurs marqués aux isotopes stables (glutamine $^{13}\text{C}_5$, leucine $^{13}\text{C}_6$, palmitate $^{13}\text{C}_{16}$), les transitions sont données dans les tableaux en annexe 12. Cette technique correspond au suivi du marquage isotopique stable d'un composé incorporé en culture cellulaire. Par exemple, après incorporation de la glutamine marquée en $^{13}\text{C}_5$, il est possible de visualiser les flux métaboliques liées à ce métabolite : cycle de Krebs, cycle de l'urée... . En effet les ions produits auront un m/z augmenté proportionnellement au nombre de ^{13}C qu'ils contiennent (e.g. +1 par ^{13}C). En conséquence, un défaut enzymatique se traduira par une variation du rapport aire du métabolite marqué versus aire du métabolite naturel. En collaboration avec le Dr Florence Habarou, cette technique de fluxomique a fait ses preuves dans la caractérisation de déficits en LCHAD, MCHAD, CrAT, P5C (résultats non présentés ici).

4.4. Résultats et discussion

J'ai généré une bibliothèque spectrale de GC-tandem MS pour 458 pics (transitions) correspondant à 120 métabolites naturels et 47 pics correspondant à 16 étalons internes (voir annexe 11). L'intérêt majeur de cette bibliothèque est qu'elle permet d'étudier plusieurs classes de métabolites en GC (au lieu de restreindre l'analyse à certaines classes comme les acides organiques), tout en éliminant les interférences malgré l'élimination des étapes de purification spécifiques de classe. L'interprétation des résultats en est facilitée, et le travail de préparation des échantillons en est considérablement réduit.

Il est probable, d'autre part, que l'élimination de toute étape de purification préalable ait pour effet supplémentaire d'augmenter la sensibilité de la technique.

Cette méthode en GC tandem MS ne donne cependant pas de spectre de masse complet comme on peut avoir en mode dit full scan pour la validation du composé. Le nombre de composés analysés en une séquence est de 120 environ mais le nombre total de transition avoisine les 500 sur des segments chevauchants de 1-2 min sur une durée totale d'élution de 35 minutes. Ceci peut avoir comme conséquence une diminution de la sensibilité par séparation du temps d'analyse (scan time en milliseconde (ms)) pour chaque transition, et des variations de sensibilité au sein d'une fenêtre de visualisation d'une transition. Notre méthode est ainsi arrivée près de la limite maximale en termes de nombre de composés identifiables en un seul run par GC-tandem MS.

Par ailleurs, j'ai généré des bibliothèques spectrales pour un nombre plus limité de composés correspondant aux dérivés de traceurs marqués aux isotopes stables (glutamine $^{13}\text{C}_5$, leucine $^{13}\text{C}_6$, palmitate $^{13}\text{C}_{16}$). Ces bibliothèques additionnelles sont donc utilisables dans des analyses de flux métabolique.

Les bibliothèques que j'ai créées sont directement implémentées dans des méthodes d'acquisition et sont donc utilisables sans aucune manipulation particulière sur les appareils compatibles. Les paramètres qu'elles contiennent (notamment les transitions et l'énergie de collision) peuvent être facilement « copiés » dans des méthodes adaptées à d'autres appareils GC-tandem MS. Les interprétations des résultats sont relativement simple et permettent de visualiser rapidement des désordres métaboliques dans des voies particulières. Il s'agit en effet de faire le ratio entre le composé marqué par isotopes stables (carbone 13, azote 15 ou deutérium principalement) provenant du composé marqué mis en culture, et le même composé naturel (sans marquage).

DISCUSSION GENERALE

Au cours de ma thèse de doctorat, je me suis intéressé aux dysfonctionnements du cycle de Krebs à l'origine de cancers, ainsi qu'aux nouveaux challenges techniques que l'étude du métabolisme des tumeurs, ou oncométabolisme, impose à la vieille tradition métabolique. En particulier, il faut désormais être en mesure de révéler et de suivre l'activité de groupes de cellules cancéreuses noyées dans un organisme normal. Cela requiert une modernisation des technologies et une adaptation des approches métaboliques traditionnelles, qui depuis longtemps trouvaient leur satisfaction dans l'étude d'organismes entiers.

L'existence de liens entre cancer et métabolisme avait été mise en évidence par Otto Warburg (prix Nobel 1931 pour la découverte de la chaîne respiratoire) au début du 20^{ème} siècle. Néanmoins, la place exacte du métabolisme dans l'ensemble des anomalies associées aux processus oncogénétiques n'a été reconnue qu'à la démonstration que certaines anomalies métaboliques ont un rôle bel et bien causal. Il a fallu ainsi identifier des mutations héréditaires dans des enzymes métaboliques qui, à l'état hétérozygote, confèrent un risque très accru de développer un cancer par perte d'hétérozygotie dans le tissu tumoral (SDH et FH, ci-dessous). La notion de causalité a été renforcée par la démonstration que ces mutations apparaissant *de novo* au niveau somatique sont à l'origine de tumeurs (IDH, ci-dessous). Les enzymes correspondantes appartiennent toutes au cycle de Krebs et comprennent :

- la succinate déshydrogénase (SDH, associée aux paragangliomes et phéochromocytomes) qui contient quatre sous-unités (A-D) qui peuvent toutes être mutées, bien que les mutations touchant la sous-unité catalytique SDHA soient beaucoup plus rares ;
- une protéine appelée SDH5/SDHAF2 nécessaire à associer le cofacteur redox FAD/FADH₂ à la sous-unité catalytique SDHA ;
- la fumarase ou fumarate hydratase (associée à la léiomyomatose héréditaire et carcinome à cellules rénales, HLRCC) ;
- les iso-enzymes 1 et 2 de l'isocitrate déshydrogénase (IDH) (associées à un grand nombre de cancers et notamment aux gliomes de bas grade et aux hémopathies malignes).

Le cycle de Krebs occupe une place majeure dans le métabolisme cellulaire et constitue le point de jonction de nombreuses voies essentielles. Sa fonction la plus connue est de centraliser la génération d'ATP cellulaire par son couplage avec la chaîne respiratoire, ce qui sous-tend le mécanisme le plus rapide et productif d'« extraction » d'énergie à partir de toute sorte de nutriments. Puisque ce processus dépend notoirement de la consommation d'oxygène, il a été naturel de proposer que les mutations du cycle de Krebs induisent un état de déficit énergétique semblable à l'hypoxie. Néanmoins, il est important de remarquer d'emblée que les mutations affectant directement la chaîne respiratoire ne confèrent pas un

risque de cancer, et en fait, la plupart des nombreuses autres anomalies héréditaires du métabolisme connues ne sont pas associées au développement de cancers – ce qui explique, justement, que la proposition du lien entre métabolisme et cancer par Warburg ait été négligée pendant presque cent ans. Ainsi le rôle du cycle de Krebs dans le cancer est probablement situé à un niveau différent du catabolisme énergétique, donc essentiellement soit au niveau de son rôle (inverse) dans l'anabolisme, soit par des effets dans la *régulation* de processus cellulaires autres que strictement métaboliques, dont certains seulement miment une hypoxie (ce que l'on appelle, généralement, *pseudohypoxie*).

Alors que le rôle des processus anaboliques dans le cancer est bien étudié, un rôle anabolique éventuel du cycle de Krebs semble limité à l'inversion occasionnelle d'une partie du cycle (impliquant justement les enzymes IDH), ce qui n'a été étudié que très accessoirement en rapport avec les mutations touchant les enzymes IDH, SDH, ou FH. La plupart des connaissances concernant le cycle de Krebs se situent au niveau des effets de ces mutations sur la régulation cellulaire. En effet, l'alpha-cétoglutarate (a-KG) est non seulement le produit des enzymes IDH normales et le substrat des enzymes IDH mutées, mais il est utilisé comme substrat de beaucoup d'autres enzymes cellulaires : les dioxygénases cellulaires a-KG-dépendantes. Ces enzymes utilisent a-KG et oxygène pour placer un groupement hydroxyle sur certaines protéines et en réguler ainsi la dégradation (HIF-1a [Wang G *et al.*, 2014]) ou l'activité (notamment des acteurs majeurs de l'épigenèse : les protéines JMJ dans la déméthylation des histones ; protéines TET dans la déméthylation de l'ADN [Abdel-Wahab *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2012]). Les produits de ces réactions enzymatiques sont le succinate et le CO₂. Il est donc évident que le succinate et son analogue structural, le fumarate, peuvent exercer une inhibition sur ces réactions lorsqu'ils s'accumulent (« inhibition par le produit »), ce qui a été ensuite démontré formellement pour certaines enzymes [Xiao *et al.*, 2012]. Il a été également suggéré que, dans les cas des mutations *IDH* (cf ci-dessous), l'accumulation anormale de D-2-HG, qui a une ressemblance structurale évidente avec l'alpha-cétoglutarate (a-KG), puisse induire une compétition entre 2-HG et a-KG en inhibant ainsi l'activité de ces dioxygénases cellulaires. Néanmoins, il s'agit d'un compétiteur faible dans les systèmes étudiés jusqu'ici [Xu *et al.*, 2011]. D'autre part, dans le cas des mutations *IDH*, d'autres mécanismes sont possibles : le défaut de production d'a-KG par une inhibition de l'enzyme normale (dominance négative [Gupta *et al.*, 2013]) et il n'est pas inconcevable de supposer une surconsommation d'a-KG via l'élimination pure et simple du 2-HG par excrétion dans les urines où il s'accumule notamment dans les leucémies.

Les mécanismes des cancers liés au cycle de Krebs sont encore très débattus. Le mécanisme de la dégradation accrue de HIF-1a est le plus étudié. HIF-1a est le régulateur le plus important de la réponse cellulaire à l'hypoxie, et son activation, par d'autres moyens que l'hypoxie, est appelée pseudohypoxie. HIF-1a est un facteur de transcription dont l'action sur l'expression d'un grand nombre de gènes a pour effet notoire d'augmenter la glycolyse et d'inhiber la chaîne respiratoire [Marin-Hernandez *et al.*, 2009]. Néanmoins, la forme de 2-

HG produite par les mutations *IDH* (le D-2-HG) n'agit pas via HIF1- α au moins dans certains contextes [Losman *et al.*, 2013] ; cf. ci-dessous. Un stress redox a également été observé dans les tumeurs SDH et FH mutées, mais ces effets ont été contestés (e.g., [Cervera *et al.*, 2008]).

L'action du 2-HG sur les dioxygénases de type TET (TET1 et TET2) a été étudiée plus récemment [Koivunen *et al.*, (2012)]. Les auteurs ont montré une inhibition par les deux formes D et L du 2-HG, avec une plus forte activité inhibitrice par le L-2-HG. Les deux isomères inhibent l'HIF hydroxylase d'asparaginyl (HIF1AN) et JMJD2D. La forme L est plus à même d'inhiber les HIF Prolyl-4-hydroxylases (EGLN1, EGLN2 et EGLN3) comparé à la forme D. Contrairement à ce qui avait été initialement proposé, du moins dans certains modèles cellulaires, ces mêmes auteurs ont montré que le D-2-HG promeut l'activité de EGLN1 et EGLN2 aux concentrations pathologiques (quelques mmol/L). Ainsi l'effet du 2-HG est différent selon les stéréoisomères, les différentes formes de dioxygénases potentiellement ciblées, et peut-être le contexte cellulaire [Losman *et al.*, 2013].

La découverte du rôle causal des mutations *IDH* a été particulièrement riche en renseignements et a ouvert à la mise en place des premières thérapies oncométaboliques personnalisées. En particulier, les mutations des gènes *IDH* sont présentes dans 15 à 20 % des leucémies aiguës myéloïdes (LAM) et jusqu'à 80 % des gliomes. Ces mutations touchent très sélectivement des résidus présents dans le site actif des enzymes et induisent une néo-fonction enzymatique se traduisant par la production et l'accumulation d'un métabolite, le stéréoisomère D du 2-hydroxyglutarate (D-2-HG) responsable donc de dérégulations cellulaires.

Par mon travail de thèse, j'ai démontré que le taux sérique en D-2-HG est un marqueur prédictif de la présence de mutations *IDH1* ou *IDH2* chez des patients atteints de LAM. J'ai établi l'importance de ce biomarqueur à la fois pour le diagnostic et pour le suivi de ces patients. En effet, sur une cohorte de 150 patients, dont 53 ayant une LAM avec mutation *IDH1/2*, nous avons montré que le taux de D-2-HG était significativement supérieur comparé aux patients *IDH* non muté ($p < 0.001$ et cut off de $2\mu\text{M}$), ce dosage est donc aussi sensible que la biologie moléculaire. De plus, les dosages réalisés au cours du suivi de ces patients possédant une mutation ont montré des taux de D-2-HG corrélant très fortement avec les marqueurs moléculaires de maladie résiduelle (WT1 et NPM1). Cette étude pilote a conduit à la mise en place du dosage de ce marqueur en pratique hospitalière courante par MS dans le laboratoire de chimie analytique de l'institut Gustave Roussy (IGR) à Villejuif.

De plus, nos collaborateurs ont décrit des inhibiteurs récemment développés sélectivement contre la mutation *IDH2 R140* dans le cadre d'études sur l'effet tumoral de ces mutations [Wang F *et al.*, 2013]. Mon travail a permis de montrer que l'un de ces inhibiteurs, l'AG-221, permet de normaliser le D-2-HG dans les fibroblastes d'un patient atteint d'acidurie D-2-hydroxyglutarique congénitale, maladie héréditaire du métabolisme extrêmement rare, associée à une mutation *IDH2 R140Q*. Des patients atteints de leucémies et de gliomes sont

actuellement traités dans le cadre d'essais cliniques aux États-Unis et en France (phase I actuellement en cours à l'institut Gustave Roussy). Il s'agit d'une belle application du principe de médecine personnalisée.

Les anomalies du métabolisme des lipides et du cycle de Krebs induites par le traitement de ces cellules par l'inhibiteur nous ont informé sur certaines conséquences fonctionnelles de la mutation. Nous avons observée une augmentation plus importante de la production de citrate à partir de la glutamine en présence de l'inhibiteur chez les fibroblastes porteurs de la mutation *IDH2* par rapport aux fibroblastes contrôles. Cela suggère que, chez les fibroblastes mutés, il y ait une synthèse accrue d' α -KG pour compenser sa transformation accrue et anormale en 2-HG, et que l'inhibiteur redirige cet α -KG supplémentaire vers le reste du cycle de Krebs. Le type de marquage du citrate (figure 15) suggère que le Krebs fonctionne alors en partie dans le sens normal (marquage m+4 du citrate), et en partie en sens inverse (marquage m+3 et m+5), ce qui s'associe généralement à une augmentation de la lipogénèse. Néanmoins, nous n'avons pas pu mettre en évidence une utilisation éventuelle du citrate pour la synthèse des lipides (absence de marquage dans ces derniers), et bien au contraire, l'inhibiteur réduit la quantité et la taille des gouttelettes lipidiques dans les fibroblastes traités.

Ainsi le phénotype métabolique induit par les mutations *IDHs*, et l'accumulation de 2-HG, est plutôt celui d'une augmentation de la lipogénèse, antagonisée donc par les inhibiteurs spécifiques des enzymes mutées. En ce sens, ces anomalies du cycle de Krebs ont bien un effet pro-anabolique par un mécanisme qui reste à déterminer, mais qui pourrait s'apparenter d'autres mécanismes impliquant l'inversion de cette partie du cycle de Krebs [Wise *et al.*, 2011]. D'autre part, de même qu'une diminution de la lipogénèse, nous avons observé une diminution de la bêta-oxydation des acides gras chez les cellules traitées à la fois chez les fibroblastes de patient porteur de mutation *IDH2 R140Q* et d'un contrôle. D'autre part le métabolome suggère d'autres altérations métaboliques assez larges qui sont indépendantes du génotype, comme une augmentation importante de la méthyladénosine libre (figure 13). Ainsi il semble que l'inhibiteur ait des effets off-target dont la relevance clinique reste à déterminer. D'autre part, malgré l'apparente normalisation de la concentration de 2-HG, l'inhibiteur ne semble pas corriger toutes les anomalies associées à la mutation *IDH2 R140Q*, puisque le N-acétylaspartate (dont l'importance a été soulignée dans le gliomes) reste à des niveaux bas, malgré le traitement, spécifiquement dans les fibroblastes porteurs de la mutation (data not shown). Il est possible que la baisse de N-acétylaspartate soit en rapport avec le caractère perte de fonction d'IDH et non avec la production de 2-HG.

L'étude des profils métaboliques associés aux mutations *IDH2* et *SDH* (dans des modèles cellulaires et chez des patients) nous a permis d'identifier des mécanismes compensatoires du dysfonctionnement du cycle de Krebs, tels qu'une augmentation de la synthèse de l' α -KG (fibroblastes porteurs de la mutation *IDH2 R140Q*, cf plus haut) et la sur-activation de la

pyruvate carboxylase dans les phéochromocytomes (manuscrit sous révision; chapitre 3). Nos collaborateurs ont montré par des études de flux que, dans le modèle cellulaire des phéochromocytomes SDH mutés, la production d'aspartate à partir du pyruvate augmente, alors que nous avons montré que la concentration absolue d'aspartate diminue à l'état stationnaire à la fois dans le même système *in vitro*, et dans le plasma d'une patiente atteinte de déficit congénital en pyruvate carboxylase. Cela indique que dans la tumeur, il existe une consommation d'aspartate supérieure à la normale, alors que le taux de production d'aspartate n'est pas suffisant, bien que des mécanismes compensatoires soient bien suractivés : la surexpression de la pyruvate carboxylase et celle de l'un des transporteurs de l'aspartate, appelé citrine. Puisque ces mécanismes ne sont que partiellement efficaces, ils pourraient servir de cibles thérapeutiques. En effet, un inhibiteur connu des transporteurs de l'aspartate (le diéthylpyrocarbonate) induit une forte diminution de la prolifération cellulaire, action sélective des cellules SDH mutées.

Une étude très récente a identifié un autre talon d'Achille des tumeurs associées aux mutations *IDH*. Il s'agit de l'inhibition partielle de la chaîne respiratoire par l'accumulation de 2-HG. Cela rend les cellules plus susceptibles à des inhibiteurs classiques de la chaîne respiratoire comme le cyanure, et également à des activateurs nouvellement identifiés de l'apoptose, par un mécanisme qui fait intervenir la chaîne respiratoire [Chan *et al.*, 2015].

Mes travaux ont été possibles grâce aux méthodes analytiques que j'ai développées, permettant :

- la séparation et la quantification des stéréoisomères D et L du 2-HG par dérivation chirale (GC tandem MS)
- l'analyse de plus de 120 composés d'intérêt clinique (méthodes métabolomiques ciblées à haute spécificité, en GC tandem MS)
- l'étude de flux métaboliques sur cellules en culture, utilisant des dérivés de traceurs marqués à l'aide d'isotopes stables
- l'analyse de 360 métabolites par une approche de LC-MS à haute résolution et non-ciblée (masse exacte).

Une publication parue en 2014 reprend en détail l'utilisation de glutamine ¹³C pour des études de flux métabolique [Zhang *et al.*, 2014]. Les études métabolomiques réalisées sur des fibroblastes présentent en général un nombre de composés similaire à notre étude, 172 par exemple dans une étude de Lemons [Lemons *et al.*, 2010].

Mon travail de thèse a ainsi apporté de nouveaux outils pour l'exploration des maladies métaboliques traditionnelles ainsi que pour les cancers lorsqu'ils sont associés à des mutations des gènes du cycle de Krebs. Il illustre la puissance de l'approche métabolique dans l'identification des points d'intervention et de surveillance thérapeutique personnalisée des patients ("théranostique").

BIBLIOGRAPHIE

- Abdel-Wahab O., Tefferi A., Levine R.L., (2012) Role of TET2 and ASXL1 mutations in the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Hematol Oncol Clin North Am.* October ; 26(5): 1053–1064.
- Abdel-Wahab O., Levine R.L., (2010) Metabolism and the leukemic stem cell. *J.Exp. Med.* Apr 12;207(4):677-80.
- Akbay E.A., *et al.*, D-2-hydroxyglutarate produced by mutant IDH2 causes cardiomyopathy and neurodegeneration in mice. *Genes Dev.* 2014 Mar 1;28(5):479-90.
- Aharoni A., Ric De Vos C.H., *et al.*, (2002) Nontargeted metabolome analysis by use of Fourier Transform Ion Cyclotron Mass Spectrometry. *OMICS* ;6: 217-34.
- Ashraf S., *et al.*, (2013) Rapid detection of *IDH2* (R140Q and R172K) mutations in acute myeloid leukemia. *Ann. Hematol.* Oct;92(10):1319-23.
- Baysal B. E., *et al.*, (2000) Mutations in *SDHD*, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science* 287, 848-851.
- Brown S.C., Kruppa G., Dasseux J.L., (2005) Metabolomics applications of FT-ICR mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* ;24: 223-31.
- Burnichon N., *et al.*, (2010) *SDHA* is a tumor suppressor gene causing paraganglioma. *Hum Mol Genet* 19, 3011-3020.
- Catteau A., *et al.*, (2014) A new sensitive PCR assay for one-step detection of 12 *IDH1/2* mutations in glioma. *Acta Neuropathol Commun.* Jun 2;2:58.
- Cervera A.M., Apostolova N., Crespo F.L., Mata M., McCreath K.J., (2008) Cells silenced for *SDHB* expression display characteristic features of the tumor phenotype. *Cancer Res.* Jun 1;68(11):4058-67.
- Chaturvedi A. *et al.*, (2013) Mutant *IDH1* promotes leukemogenesis in vivo and can be specifically targeted in human AML. *Blood.* Oct 17;122(16):2877-87.
- Chan S.M. *et al.*, (2015) Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations induce BCL-2 dependence in acute myeloid leukemia. *Nat. Med.* Feb;21(2):178-84.
- Chen C., Liu Y., Lu C., Cross J.R., Morris 4th J.P., Shroff A.S. *et al.*, (2013) Cancer-associated *IDH2* mutants drive an acute myeloid leukemia that is susceptible to Brd4 inhibition. *Genes Dev*; 27: 1974–1985.
- Courtney R., Ngo D.C., Malik N., Ververis K., Tortorella S.M., Karagiannis T.C., (2015) Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K. *Mol Biol Rep.* Apr;42(4):841-51.
- Dang L., *et al.*, (2009) Cancer-associated *IDH1* mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 2009; 462: 739–744.
- Dang L. *et al.*, (2010) *IDH* mutations in glioma and acute myeloid leukemia. *Trends Mo Med.* Sep;16(9):387-97.
- Dinardo, C.D., *et al.*, (2013) Serum 2-hydroxyglutarate levels predict isocitrate dehydrogenase mutations and clinical outcome in acute myeloid leukemia. *Blood.* Jun 13; 121(24):4917-24.
- Duncan C.G. *et al.*, (2012) A heterozygous *IDH1R132H/WT* mutation induces genome-wide alterations in DNA methylation. *Genome Res.* Dec;22(12):2339-55.

- Duran M., Kamerling J.P., Bakker H.D., van Gennip A.H., Wadman S.K. (1980) L-2-Hydroxyglutaric aciduria: an inborn error of metabolism? *J Inher Metab Dis.* 3(4):109-12.
- Ferreira A.K., Santana-Lemos B.A., Rego E.M., Filho O.M., Chierice G.O., Maria D.A. (2013) Synthetic phosphoethanolamine has in vitro and in vivo anti-leukemia effects. *Br J Cancer.* Nov 26;109(11):2819-28.
- Figuerola M.E., Abdel-Wahab O., Lu C., *et al.*, (2010) Leukemic *IDH1* and *IDH2* mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* 18(6), 553–567.
- Gaidzik V.I., *et al.*, (2012) TET2 mutations in acute myeloid leukemia (AML): results from a comprehensive genetic and clinical analysis of the AML study group. *J; Clin. Oncol.* Apr 20;30(12):1350-7
- Garrett-Bakelman F.E., Melnick A.M., (2013) Differentiation Therapy for IDH1/2 mutant malignancies. *Cell. Res.*, Aug; 23(8):975-977.
- Gibson K.M., ten Brink H.J., Schor D.S., Kok R.M., Bootsma A.H., Hoffmann G.F., Jakobs C. (1993) Stable-isotope dilution analysis of D- and L-2-hydroxyglutaric acid: application to the detection and prenatal diagnosis of D- and L-2-hydroxyglutaric acidemias. *Pediatr Res.* Sep;34(3):277-80.
- Gross S., Cairns R.A., Minden M.D., *et al.*, (2010) Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. *J. Exp. Med.* 207(2), 339–344.
- Gupta R., *et al.*, (2013) Expanding the spectrum of *IDH1* mutations in gliomas. *Mod Pathol.* 2013 May;26(5):619-25.
- Hanahan D., Weinberg R.A., (2000) The Hallmarks of cancer. *Cell.* Jan7;100(1):57-70
- Hanahan D., Weinberg R.A., (2011) Hallmarks of cancer : the next generation. *Cell.* Mar 4;144(5):646-74.
- Hatzimanikatis V., *et al.*, (2004) Metabolic networks: enzyme function and metabolite structure. *Curr Opin Struct Biol.*, Jun;14(3):300-6.
- Horbinski C., Kofler J., Kelly L.M., Murdoch G.H., Nikiforova M.N., (2009) Diagnostic use of *IDH1/2* mutation analysis in routine clinical testing of formalin-fixed, paraffin-embedded glioma tissues. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 68(12), 1319–1325.
- Janin M. *et al.*, (2014) Serum 2-hydroxyglutarate production in IDH1- and IDH2-mutated de novo acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association Group. *J Clin Oncol* 2014; 32: 297–305.
- Jia G., Fu Y., Zhao X., Dai Q., Zheng G., Yang Y., Yi C., Lindahl T., Pan T., Yang Y.G., He C., (2011) N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat Chem Biol.* Oct 16;7(12):885-7.
- Kats L.M., *et al.*, (2014) Proto-oncogenic role of mutant IDH2 in leukemia initiation and maintenance. *Cell Stem Cell.* Mar 6;14(3):329-41.
- Kil I.S., *et al.*, (2007) Small interfering RNA-mediated silencing of mitochondrial NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase enhances the sensitivity of HeLa cells toward tumor necrosis factor- α and anticancer drugs. *Free Radic. Biol. Med.* 43(8), 1197–1207.
- Koivunen P., *et al.*, (2012) Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation. *Nature.* Feb 15;483(7390):484-8.

- Kranendijk M., Struys E.A., *et al.*, (2010). *IDH2* mutations in patients with D-2-hydroxyglutaric aciduria. *Science* 330: 336.
- Lee S.H., *et al.*, (2004) Role of NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase (NADP⁺-ICDH) on cellular defence against oxidative injury by gamma-rays. *Int. J. Radiat. Biol.* 80(9), 635–642.
- Lee S.M., *et al.*, (2009) Silencing of cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase by small interfering RNA enhances the sensitivity of HeLa cells toward staurosporine. *Free Radic. Res.* 43(2), 165–173.
- Lemons J.M.S., *et al.*, (2010) Quiescent Fibroblasts Exhibit High Metabolic Activity. *PLoS Biol* 8(10):e1000514.
- Lepoutre-Lussey C., *et al.*, (article soumis) Metabolic re-wiring in succinate dehydrogenase deficient cells.
- Letouzé E., *et al.*, (2013) SDH Mutations Establish a Hypermethylator Phenotype in Paraganglioma. *Cancer Cell* 23, 739–752, June 10.
- Losman J.A., Kaelin W.G. Jr, (2013) What a difference a hydroxyl makes: mutant IDH, (R)-2-hydroxyglutarate, and cancer. *Genes Dev.* 27:836-852
- Losman JA, Looper RE, Koivunen P, Lee S, Schneider RK, McMahon C, Cowley GS, Root DE, Ebert BL, Kaelin WG Jr 2013 (R)-2-hydroxyglutarate is sufficient to promote leukemogenesis and its effects are reversible. *Science*. Mar 29;339(6127):1621-5.
- Lu C., Ward P., Kapoor G., *et al.*, (2012) *IDH* mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation *Nature* 483, 474–478.
- Lu J., Tan M., Cai Q., (2015) The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer Lett.* Jan 28;356(2 Pt A):156-64.
- Luchman H.A. *et al.*, (2012) An in vivo patient-derived model of endogenous IDH-mutant glioma. *Neuro Oncol.* Feb;(2):184-91.
- MacKenzie E.D., *et al.*, (2007) Cell-permeating alpha-ketoglutarate derivatives alleviate pseudohypoxia in succinate dehydrogenase-deficient cellss. *Mol. Cell. Biol.* 27:3282-3289.
- Mardis, E.R., *et al.*, (2009) Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl. J. Med.* 361, 1058-1066.
- Marín-Hernández A., *et al.*, (2009) HIF-1alpha modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Mini Rev Med Chem.* Aug;9(9):1084-101.
- Metellus P., *et al.*, (2011) *IDH* mutation status impact on in vivo hypoxia biomarkers expression: new insights from a clinical, nuclear imaging and immunohistochemical study in 33 glioma patients. *J. Neurooncol.* 105(3), 591–600.
- Mylonas E., *et al.*, (2014) Isocitrate dehydrogenase (*IDH*)2 R140Q mutation induces myeloid and lymphoid neoplasms in mice *Leukemia* 28, 1343–1346; doi:10.1038/leu.2014.18
- Naoe T., Kiyoi H., (2013) Gene mutations of acute myeloid leukemia in the genome ear. *Int. J. Hematol.* Feb;97(2):165-74.
- Oliver S.G., Winson M.K., Kell D.B., Baganz F., (1998) Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol.* Sep;16(9):373-8.

- Parsons D.W., *et al.*, (2008) An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. Sep 26;321(5897):1807-12.
- Patel J.P., Gönen M., Figueroa M.E., *et al.*, (2012) Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 366:1079- 1089.
- Pollard P.J., Brière J.J., *et al.*, (2005) Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1alpha in tumours which result from germline FH and SDH mutations. *Hum Mol Genet*. Aug 1;14(15):2231-9.
- Prensner J.R., Chinnaiyan A.M., (2011) Metabolism unhinged: *IDH* mutations in cancer. *Nat. Med*. Mar;17(3):291-3.
- Preusser M., *et al.*, (2011) IDH testing in diagnostic neuropathology: review and practical guideline article invited by the Euro-CNS research committee. *Clin Neuropathol*. Jul-Aug;31(4):206-9.
- Reitman Z.J., Yan H., (2010) Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism. *J. Natl Cancer Inst*. 102(13),932-941.
- Reitman Z.J., Jin G., Karoly E.D., *et al.*, (2011) Profiling the effects of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations on the cellular metabolome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 22;108(8):3270-5.
- Ritchie M.D. *et al.*, (2015) Methods of integrating data to uncover genotype–phenotype interactions. *Nat Rev Genet*. 2015 Feb;16(2):85-97.
- Rohle D., Popovici-Muller J., (2013) An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells. *Science*. May 3;340(6132):626-30.
- Saha SK *et al.*, (2014) Mutant IDH inhibits HNF-4α to block hepatocyte differentiation and promote biliary cancer. *Nature*. Sep 4;513(7516):110-4.
- Sasaki M., *et al.* (2012) D-2-hydroxyglutarate produced by mutant IDH1 perturbs collagen maturation and basement membrane function. *Genes Dev*. 26(18), 2038–2049.
- Sasaki M., Knobbe C.B., Munger J.C., *et al.*, (2012) *IDH1(R132H)* mutation increases murine haematopoietic progenitors and alters epigenetics. *Nature*; 488: 656–659.
- Selak M.A., *et al.*, (2005) Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*. Jan;7(1):77-85.
- Struys E.A., Jansen E.E., Verhoeven N.M., Jakobs C., (2004) Measurement of urinary D- and L-2-hydroxyglutarate enantiomers by stable-isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry after derivatization with diacetyl-L-tartaric anhydride. *Clin Chem*. Aug;50(8):1391-5.
- Struys E.A., (2013) 2-Hydroxyglutarate is not a metabolite; d-2-hydroxyglutarate and l-2-hydroxyglutarate are! *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 17; 110(51): E4939.
- Turcan S., *et al.*, (2012) *IDH1* mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature*. Feb 15;483(7390):479-83.
- Van Den Bent M.J., *et al.*, (2013) Interlaboratory comparison of *IDH* mutation detection. *J. Neurooncol*. Apr;112(2):173-8.
- Vander Heiden M.G., Cantley L.C., *et al.*, (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. May 22;324(5930):1029-33.

Walker W.D., *et al.*, (2006) Hypersensitivity to oxygen and shortened lifespan in a *Drosophila* mitochondrial complex II mutant. PNAS 103 (44) 16382-16387.

Wang F., Travins J., DeLaBarre B., (2013) Targeted inhibition of mutant IDH2 in leukemia cells induces cellular differentiation. Science 340(6132), 622–626.

Wang G., Sai K., Gong F., Yang Q., Chen F., Lin J., (2014) Mutation of isocitrate dehydrogenase 1 induces glioma cell proliferation via nuclear factor- κ B activation in a hypoxia-inducible factor 1- α dependent manner. Mol Med Rep. May;9(5):1799-805.

Wang J.H., *et al.*, (2013) Prognostic significance of 2-hydroxyglutarate levels in acute myeloid leukemia in China. PNAS 110 (42) 17017-17022.

Ward P.S., Cross J.R., Lu C., *et al.*, (2012) Identification of additional *IDH* mutations associated with oncometabolite R(-)-2-hydroxyglutarate production. Oncogene 31(19), 2491–2498.

Ward P.S., *et al.*, 2010 The common feature of leukemia-associated *IDH1* and *IDH2* mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. Cancer Cell. 17:225-234.

Wise D.R., Ward P.S., *et al.*, (2011) Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of α -ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. Proc Natl Acad Sci U S A. Dec 6;108(49):19611-6.

Xiao M., *et al.*, (2012) Inhibition of α -KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. Genes Dev. Jun 15;26(12):1326-38.

Xu W., Yang H., *et al.*, (2011) Oncometabolite 2-Hydroxyglutarate Is a Competitive Inhibitor of α -Ketoglutarate-Dependent Dioxygenases. Cancer Cell. Jan 18; 19(1): 17–30.

Yan H., Parsons D.W., Jin G., *et al.*, (2009) *IDH1* and *IDH2* mutations in gliomas. N. Engl. J. Med. 360(8), 765–773.

Yang H., Ye D., *et al.*, (2012) *IDH1* and *IDH2* mutations in tumorigenesis: mechanistic insights and clinical perspectives. Clin. Cancer Res., Oct 15;18(20):5562-71.

Zhang J., *et al.*, (2014) ^{13}C isotope-assisted methods for quantifying glutamine metabolism in cancer cells. Methods Enzymol. 542:369-89. doi: 10.1016/B978-0-12-416618-9.00019-4.

WEBGRAPHIE

WS Ref1 : <http://www.hmdb.ca/>

WS Ref2 : <http://www.arcagy.org/infocancer/localisation/hemopathie-malignes-cancers-du-sang/leucemies-aigues/traitements/leucemie-myeloblastique.html>

WS Ref3 : <http://www.cancer.org/cancer/leukemia-acutemyeloidaml/detailedguide/leukemia-acute-myeloid-myelogenous-key-statistics>

WS Ref4 : http://sfh.hematologie.net/hematolo/UserFiles/File/PDF/Leucemieaigue_myeloide.pdf.

WS Ref5 : <http://slideplayer.fr/slide/481378/>

5.1 Annexes référencés dans l'écrit

Annexe 1 : Les différents sous-types de LAM

a) Classification FAB.

Sous-type FAB	Nom courant	% approximatif de cas
M0	Leucémie aiguë myéloïde avec peu de signes de différenciation myéloïde	1 à 6
M1	Leucémie aiguë myéloblastique sans maturation	11 à 19
M2	Leucémie aiguë myéloblastique avec maturation	25 à 30
M3	Leucémie promyélocytaire aiguë (LPA)	3 à 12
M4	Leucémie aiguë myélomonocytaire	15 à 23
M4Eo	Leucémie aiguë myélomonocytaire avec éosinophilie	2 à 6
M5	Leucémie aiguë monocytaire/monoblastique	13 à 29
M6	Érythroleucémie aiguë	1 à 5
M7	Leucémie aiguë mégacaryoblastique	4 à 14

b) Classification de l'OMS des différents sous-types de LAM.

Nom	Sous-types inclus
Leucémie aiguë myéloïde (LAM) avec anomalies génétiques récurrentes	<p>LAM avec t(8;21)</p> <p>LAM avec éosinophiles anormaux dans la moelle osseuse et inv (16) ou t(16;16)</p> <p>Leucémie promyélocytaire aiguë avec t(15;17) et variantes</p> <p>LAM avec anomalies du gène <i>MLL</i></p>

LAM avec dysplasie multilignée	LAM secondaire à un SMD ou à un SMP
LAM et SMD secondaires à un traitement	causés par des agents alkylants causés par des inhibiteurs de la topoisomérase de type II
LAM, non classée ailleurs	LAM minimalement différenciée LAM sans maturation LAM avec maturation Leucémie aiguë myélomonocytaire Leucémie aiguë monocytaire/monoblastique Leucémie érythroblastique aiguë Leucémie aiguë mégacaryoblastique Leucémie aiguë à basophiles Panmyélose aiguë avec myélofibrose sarcome myéloïde/granulocytaire (chlorome)
SMD/Syndrome myéloprolifératif (SMP)	Leucémie myélomonocytaire chronique Leucémie myéloïde chronique atypique Leucémie myélomonocytaire juvénile SMD/SMP non classable
SMD	Anémie réfractaire Cytopénie réfractaire

Annexe 2 : Les leucémies myéloïdes aiguës

a) Prévalence

En 2014, les Etats-Unis comptaient une population de 316 millions de citoyens. Environ 52 000 cas (0.16%) de leucémies chez des enfants ont été diagnostiqués et 24 000 patients sont décédés. Pour ce qui est des LAM, environ 18 860 nouveaux cas sont diagnostiqués, surtout chez des adultes, et le nombre de décès atteint 10 460 [WS ref 2]. Seulement 25% des cas sont diagnostiqués chez des personnes de moins de 25 ans et l'âge moyen au diagnostic est de 65 ans. Parmi les nouveaux cas diagnostiqués, environ 16% (3100 cas) correspondent à des patients possédant au départ un syndrome myélodysplasique qui à progressé en LAM. Enfin la majorité des adultes diagnostiqués ont un caryotype normal.

b) Diagnostic

Le diagnostic est parfois évoqué par certains signes comme une fatigue (dû à une anémie), des infections. Ainsi, le médecin pourra demander au patient l'historique de ces signes et une possible exposition à des facteurs à risques tels que des agents mutagènes, de précédentes chimiothérapies ou traitements via des rayons ionisants. Une précédente maladie touchant la moelle osseuse (myélodysplasie) comme un syndrome myélodysplasique (SMD) par exemple, peut également être une cause de la survenue d'une LAM.

Durant l'examen physique, le médecin portera une attention particulière aux yeux, à la bouche, à la peau, aux ganglions lymphatiques, au foie et à la rate, au système nerveux (dû au possible passage de blastes jusqu'au liquide céphalorachidien), mais aussi à des zones de saignements, des hématomes (dû à une thrombopénie) et à de possibles signes d'infection [WS Ref 3].

Une numération formule sanguine (NFS) sera prescrite en cas de signes pouvant indiquer une possible relation des symptômes avec une variation du nombre de cellules sanguines. Si cet examen évoque une leucémie, d'autres tests seront alors menés par un cancérologue.

Généralement, une ponction de moelle osseuse est pratiquée dans un os plat (sternum ou os iliaque) afin de réaliser un myélogramme. Cette technique est invasive mais permet cependant d'analyser la présence de cellules cancéreuses visibles au microscope : correspondant à un taux supérieur à 20% de cellules immatures, et la morphologie de ces cellules immatures renseigne quant à la lignée cellulaire concernée. D'autres analyses de biologie moléculaire permettent de mettre en évidence de possibles anomalies génétiques, critères déterminants pour le choix du traitement, le diagnostic et le pronostic.

Enfin, une ponction lombaire de liquide céphalorachidien peut être envisagée pour déceler de possibles atteintes neurologiques [WS Ref 4].

Les différentes sous-types de LAM

La leucémie aiguë myéloïde (LAM) prend naissance dans une des cellules jeunes de la moelle osseuse qui suivent :

- Les myéloblastes : cellules qui deviennent des granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles)
- Les monoblastes : cellules qui deviennent des monocytes et des macrophages
- Les érythroblastes : cellules qui deviennent des globules rouges
- Les mégacaryoblastes : cellules qui deviennent des mégacaryocytes (cellules qui fabriquent les plaquettes).

Le tableau présentant l'actuelle classification FAB (Franco-Américain-Britannique) des 8 sous-types de LAM est présenté en annexe 1 a).

Le système proposé par l'organisation mondiale de la santé (OMS) est plus récent et prend en considération les causes cytogénétiques de la LAM (annexe 1 b)).

Mutations génétiques et interactions entre elles

Différentes mutations peuvent être à l'origine de la survenue d'une LAM. Ces mutations sont classées en 3 groupes : une classe I qui cause l'activation constitutive des signaux intracellulaires qui contribuent à la survie et au développement de la cellule, une classe II de mutations qui bloquent la différenciation et/ou augmente le renouvellement propre de la cellule par une altération des facteurs de transcription. Enfin une troisième classe de mutation peut être défini comme regroupant les mutations ayant une action épigénétique (figure 18 ci-après).

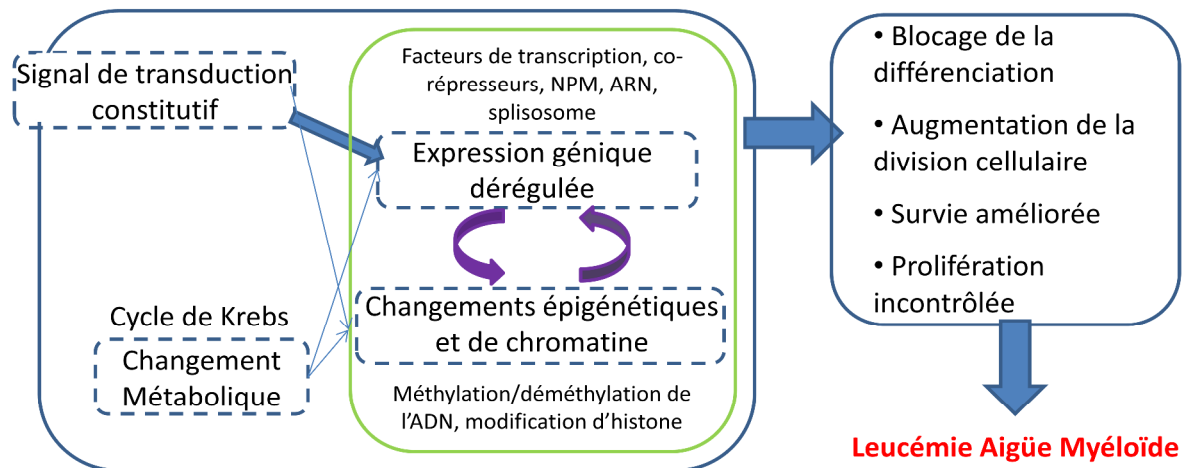


Figure 18 : Diagramme schématisant la signalisation intracellulaire associée aux LAM. Figure reprise de T. Naoe, H. Kiyoi, 2013.

Ces mutations de classe III peuvent affecter des modificateurs épigénétiques comme TET2, DNMT3A, EZH2 ou encore de façon indirecte IDH1 et IDH2 par exemple, qui auront pour action une hyperméthylation de l'ADN ou de certains histones [Duncan *et al.*, 2012; Figueroa *et al.*, 2010]. Des corépresseurs de transcription comme *BCOR*, *ASXL1* peuvent être mutés, ou encore des gènes suppresseurs de tumeur comme *TP53*, *WT1*. Les variations d'activité engendrées sont responsables de l'apparition du mécanisme de tumorigénèse. Ces variations génétiques sont listées dans le tableau en annexe 3 et les interactions fréquemment identifiées dans des LAM sont représentées sur le diagramme ci-après (figure 19) [Naoe, Kiyoi, 2013].

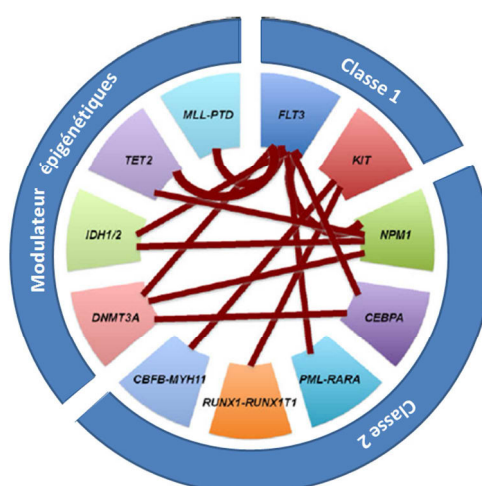


Figure 19 : Fréquentes interactions d'altérations génétiques dans les LAM, co-mutations.

Les mutations touchant les modulateurs épigénétiques co-mutent aussi bien avec les mutations de classe 1 que 2.

Une fois le diagnostic établi par le cancérologue, il convient de commencer un traitement le plus rapidement possible.

c) Traitements

Le traitement d'une LAM comporte 3 phases :

Le traitement d'**induction** par chimiothérapie standard daunorubicine et cytarabine est un succès dans environ 65% des cas de LAM. Les chances de rémission du patient dépendent de différents facteurs tels que son âge, ou encore la présence de co-mutations (mutations dont la présence ou l'absence sera une aide à l'établissement d'un pronostic).

Si il y a rémission, les patients peuvent ensuite recevoir 3 à 4 cycles de chimiothérapie dite de **consolidation**. Il s'agit en général de fortes doses de cytarabine (ara-C ou arabinose de cytosine ; HIDAC) afin de maintenir l'état de rémission chez le patient.

Enfin l'**intensification** est un traitement adapté au type de leucémie et au patient, et donc au risque de rechute. Ceci vise à prolonger la rémission vers un état de guérison.

En dernier lieu, une **surveillance** est indispensable après la fin des traitements. Celle-ci s'organise avec le médecin hématologue et est planifiée à intervalle régulier. Le but est de détecter une possible rechute, de voir les possibles effets du traitement. Une NFS est réalisée régulièrement au départ, puis de façon plus espacée.

Le traitement d'une leucémie doit débuter le plus tôt possible après le diagnostic, quelque fois dans l'heure qui suit. Le traitement est adapté en fonction du type de LAM et du stade de progression de la maladie.

Ces traitements peuvent être de différentes formes, chimiothérapie, par radiation ou par transplantation de moelle osseuse.

Les chimiothérapies

Les chimiothérapies consistent en l'utilisation de molécules anticancéreuses, souvent administrées par deux ou trois.

Pour ce qui est des LAM de l'adulte et de l'enfant, la cytarabine est administré à doses conventionnelles lors du traitement d'induction de la rémission et du traitement d'entretien, à hautes doses dans les formes dites réfractaires ou en cas de rechute.

Les anthracyclines ont été isolées chez des actinobactéries du genre *streptomyces*. Au sein de cette famille de composés, la daunorubicine est active dans les hémopathies malignes.

Enfin la prednisone est utilisée comme corticothérapie dans le cadre de certaines leucémies.

les radiations

Cette technique n'est pas beaucoup utilisée dans le cadre des traitements contre des leucémies. Elle peut néanmoins être utile si des cellules cancéreuses sont présentes au niveau du cerveau, sur des zones précises avant la transplantation de cellules souches, ou encore pour soulager le patient dans les cas de gonflement de ganglions lymphatiques, de la rate ou du foie.

la transplantation de moelle osseuse

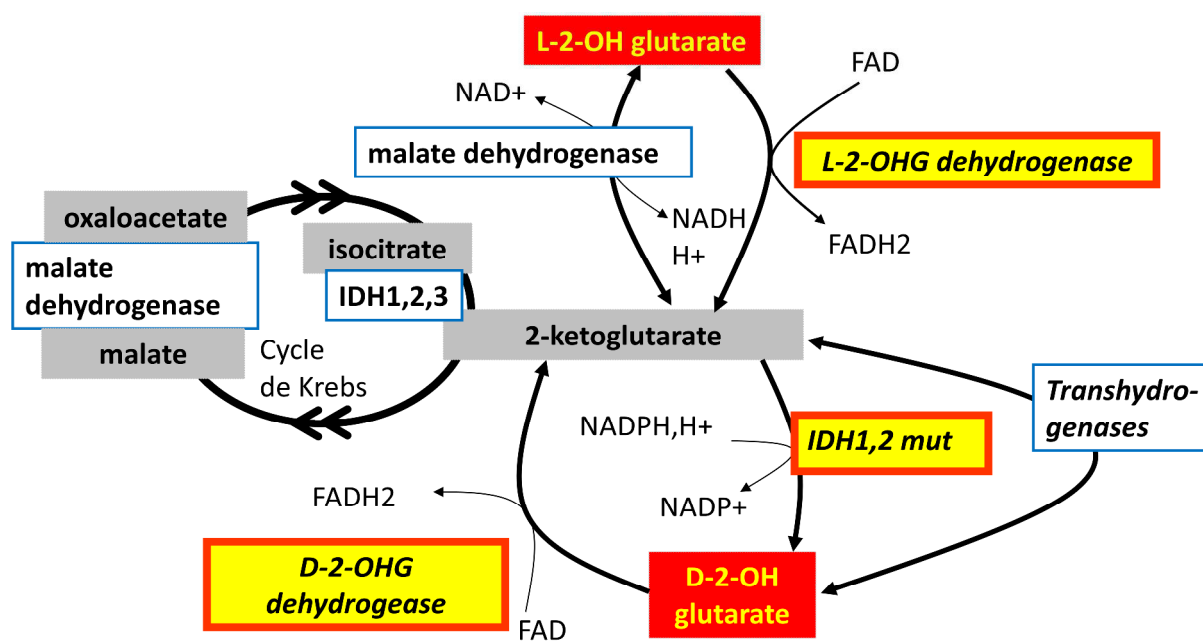
La transplantation de moelle osseuse ou de cellules progénitrices hématopoïétiques (CPH) consiste en l'introduction chez le malade de nouvelles cellules souches capables d'assurer la production de cellules sanguines.

Annexe 3 : Altérations génétiques rencontrées dans les LAM

Table 1 Recurrently mutated genes in AML

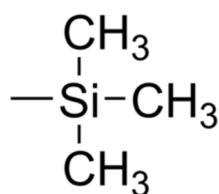
Function	Gene	Mutation frequency	Grouping
Tyrosine kinase	FLT3	ITD: 20–28 % KDM: 5–10 %	Class I
	KIT	25–30 % in CBF-AML	
	JAK1	1–3 %	
	JAK3	1–2 %	
	NRAS	9–14 %	
RAS pathway	KRAS	5–17 %	
Protein phosphatase	PTPN11	4–5 %	
Ubiquitin pathway	CBL	2–3 %	
Nuclear-cytoplasmic shuttling phosphoprotein	NPM1	25–35 %	Class II
Transcription factor	CEBPA	10–20 %	
	RUNX1	5–13 %	
	GATA2	3–5 %	
	RUNX1-RUNX1T1	10–15 %	
	CBFB-MYH11	3–8 %	
	PML-RARA	5–10 %	
	MLL fusion	5–9 %	
	DEK-NUP214	1 %	
DNA hydroxymethylation	TET2	8–27 %	Class III? (mutations in epigenetic modifiers)
	IDH1	6–9 %	
	IDH2	9–12 %	
DNA methylation	DNMT3A	18–23 %	
Histone 3 K27 methylation	EZH2	Rare in AML 8–12 % of MPN-BC	
Histone 3 K4 methylation	MLL	5–6 %	
		PTD: 5–13 %	
Histone 3 K27 tri-methylation	ASXL1	3–11 %	
Transcriptional corepressor	BCOR	4–5 %	?
	BCORL1	6 %	
Cohesin complex	STAG2	2 %	
	SMC3	3 %	
	SMC1A	3 %	
	RAD21	2 %	
Tumor suppressor	TP53	7–12 %	
	WT1	10–13 %	

Annexe 4 : Erreurs innées du métabolisme impliquant les stéréoisomères D et L du 2-HG



Annexe 5 : Protocole de silylation

Les techniques analytiques en chromatographie gazeuse exigent une préparation de l'échantillon afin de sélectionner les composés d'intérêt (extraction spécifique) et de rendre volatil les composés qui ne le sont pas naturellement. Pour se faire, il existe différents adduits (produits de dérivation) qui bien que rendant plus lourd le composé, permettent leur analyse. Dans le cas de la silylation, le groupement ajouté est le triméthylsilyle (TMS; -Si(CH₃)₃ ; m/z = 72). Il s'agit de trois groupements méthyles liés à un atome de silicium. Ce groupement se fixe aux groupements hydroxyles (-OH) ou amines (-NH₂). Les composés peuvent ainsi être plus ou moins silylés: ceci se traduit par différents pics chromatographiques.



Structure du groupement TMS.

Après extraction des composés (acétate d'éthyle en routine hospitalière), l'extrait est séché au Speed Vacuum.

Protocole de silylation :

- Ajout de 50 µL de pyridine + 50 µL de BSTFA 1% TMCS (SIGMA), bouchage et chauffage au bain sec 45' à 80°C. - Transfert du produit de silylation dans des vials avec réducteur de volume de 150 µL et bouchage avec bouchon adapté.

Passage sur GC/MS en modes d'analyse souhaité : Full Scan (ciblé et non ciblé), Single Ion Monitoring (idem : fragments et composés dosés avec étalon marqué) ou encore spectrométrie en tandem : Multiple Reaction Monitoring.

Annexe 6 : Protocole de butylation et d'acétylation pour la dérivation chirale du 2-HG

Cette technique est modifiée d'après l'article de Duran *et al.* (1980). Elle permet d'obtenir une dérivation chirale de l'acide 2-hydroxyglutarique et de distinguer ses formes D et L.

Les phases organiques (après extraction acétate d'éthyle) extraites sont séchées au speedvac (environ 40 minutes). Par échantillon, préparer en extemporané un mélange de 100 µL de (R)-(-)-2-Butanol + 8 µL HCl 1M. Ajouter 100µL du mélange à chaque résidu sec.

Chauffer 2 heures à 100°C (couvrir avec des poids pour que les bouchons restent en place et surveiller). Sécher au speedvac.

L'acétylation des fonctions hydroxyles est réalisée par ajout de 200 µL d'un mélange Pyridine/Anhydride Acétique (1/1) à chaque résidu sec.

Chauffer 30 minutes à 100°C (couvrir également avec des poids). Sécher au speedvac. Le résidu sec est repris avec 200 µL de chloroforme (vortex) avant passage en GC-MS/MS.

Préparation de l'étalon interne

- Resuspension de 40 mg a-KG marqué au $^{13}\text{C}_4$ dans 40 ml NaCl 0.9%
- Réduction d'un volume de 20 ml avec 10 ml de borohydrure de sodium (NaBH_4) dans NaOH 0.1 N (*)
- Laisser à température ambiante pour 1 heure
- Vérifier que la réaction est complète en GC-MS/MS
- Rajouter progressivement 3 volumes de HCl 2.4 N (*)
- Extraire à l'acétate d'éthyle (cf. ci-dessus), resuspendre dans NaCl 0.9%
- Conserver à -80°C
- Lors de l'utilisation, décongeler et réchauffer à 37°C pendant 5 min (*)

Cette technique représente une modification de ce qui a été présenté dans la littérature (astérisques (*) = nouvelles étapes). De plus, des étapes lourdes de purification (colonnes d'affinité, Duran *et al.*, 1980) ont été supprimées, et l'extraction permet sans doute une élimination de l'agent réducteur plus efficace que les centrifugations répétées décrites dans la publication de référence la plus récente (Struys *et al.*, 2004).

Annexe 7 : Composition du cocktail 24 étalons marqués aux isotopes stables (dans eau bidistillée):

Ce mélange a été développé pour des échantillons d'extrait cellulaire, afin d'avoir des concentrations en étalon adaptées aux concentrations des composés naturelles.

Composé marqué	Quantité par échantillon (nmol)	
	Culture cellulaire, serum	Urine
Citrate D4	2.5	25
Ethyl malonic acid D3	2.5	25
Nacétyl Aspartate D3	2.5	25
2-Hydroxyglutarate D3	2.5	25
D/L Mevalonolactone D4	0.5	5
Malonate 13C3	0.5	5
Uracil D4	0.5	5
MethylCitrate Methyl-D3	2.5	5
Hexanoyl Glycine 13C2, 15N	0.5	5
Fumarate 13C4	2.5	25
Glutarate 2,2,4,4-D4	2.5	10
Methylmalonic acid 13C4	2.5	25
Succinylacetone 13C5	2.5	25
C13 alpha-cétoglutarate 13C4 à 0,1g/L	5.0	30
Adipic acid 13C6	2.5	15
Erythritol 13C4	0.5	5
5-OH indole-3-acetic acid	0.5	5
3-METHYLGLUTACONIC ACID 13C2, 3methyl13C	2.5	10
Sodium-L-lactate 13C3	2.5	25
Glycolic acid 2.2 D2	2.5	25
Alpha-Ketoisocaproic acid 13C6	0.5	10
Propionyl-N-Glycine 13C2	0.5	5
Isovaleryl-N-Glycine 13C2, 15N	2.5	7.5
3OH Isovaleric acid 13C3	2.5	10

Annexe 8 : La chromatographie gazeuse.

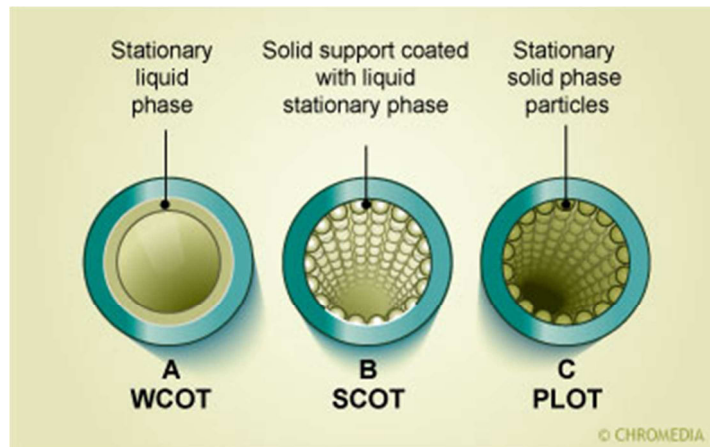
Le principe de chromatographie est comme les autres techniques chromatographiques une méthode séparative avant utilisation d'un analyseur (spectromètre de masse par exemple). Les composés en mélange dans un milieu (dans un solvant, ou en solution gazeuse) sont entraînés par un gaz vecteur (hélium en général, mais également hydrogène, azote ou argon) à pression constante (en général 1ml/minute). Ce gaz doit être le plus pur possible, et un filtre est positionné en série sur le circuit, entre la bouteille et la tête de colonne (injecteur).

Cette technique repose sur les différences d'affinités des molécules avec les constituants de la colonne (support solide). Les composés doivent être gazeux ou volatilisables par augmentation de la température, sans dégradation.

L'échantillon est injecté (0.2 à 5.0 μL) en tête de colonne et est vaporisé avant de passer dans la colonne. En sortie de colonne, dans le cadre d'une analyse en spectrométrie de masse par exemple, les composés plus ou moins séparés sont ionisés au niveau de la source (EI pour electronic impact : impact électronique).

Différents types de colonnes ont été développés en fonction des classes de molécules ciblées:

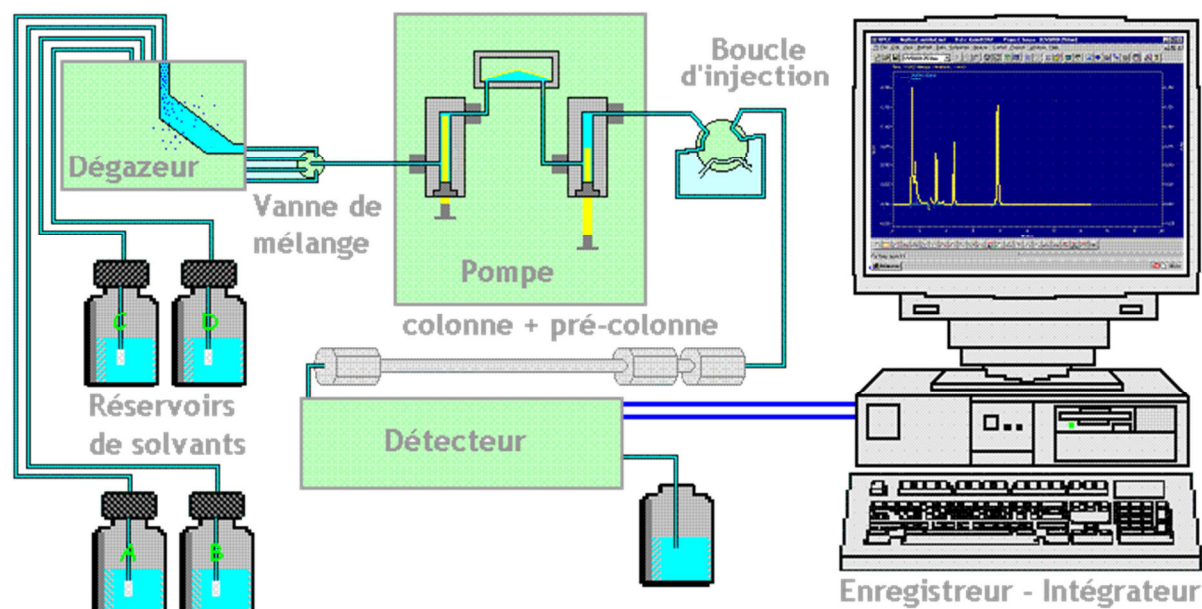
- les colonnes capillaires sont principalement utilisées, elles sont d'une longueur allant d'une quinzaine à une centaine de mètres. Elles ont un diamètre interne variant entre 0.1 et 0.5 mm et une couche de revêtement interne de 0.1 à 5 μm d'épaisseur.



- les colonnes remplies mesurant au maximum 2m.

Annexe 9 : La chromatographie en phase liquide.

La chromatographie en phase liquide (CPL ou LC en anglais) repose sur l'entraînement des composés par une phase liquide (phase mobile) à travers un solide (phase stationnaire) qui se trouve soit dans un tube (colonnes avec différentes affinités) ou sur un support (plaque pour la chromatographie sur couche mince par exemple).



Voici un schéma reprenant les différents éléments d'un ensemble LC-détecteur. (Source web : atechimie.univ-lille1.fr/chromatographie-Phase-Liquide/)

Sur le schéma ci-dessus, la pré-colonne sert de filtre pour éviter d'encrasser la colonne. Par ailleurs, les phases mobiles sont de polarités différentes, ce qui permet une élution des composés en fonction de leur affinité avec le mélange entre les deux, et de leur interaction avec la phase stationnaire. Il y a donc une séparation (-graphie vient du grec "graphein" : écrire) des composés en sortie de colonne, avant leur détection. Le développement de cette technique a permis d'utiliser de hautes pressions et un diamètre des particules des colonnes adapté aux composés analysés, ceci permettant une amélioration de la vitesse d'analyse et de la résolution des pics. (Giddings, Dynamics of chromatography. Principles and theory. Ed Marcel Dekker New York, 1965).

Annexe 10 : La spectrométrie de masse.

La spectrométrie de masse (MS en anglais pour Mass Spectrometry) est l'analyse de la masse d'un composé ionisé.

Trois parties constituent le spectromètre :

- **La source ionique** : elle sert à ioniser les molécules et leur fragments en sortie de colonne.
- **L'analyseur** : il permet de sélectionner les masses d'intérêt (entre 50 et 650 m/z par exemple en mode full scan).
- **Le détecteur** : il mesure la masse de chaque fragment électroniquement (DDP).

A cause du fait que les ions sont très réactifs et instables, leur formation et analyse se fait sous vide. L'appareil fonctionne à une pression de 10^{-5} à 10^{-8} torr soit moins d'un milliardième de la pression atmosphérique. Ces ions sont générés au niveau de la **source d'ion** : ensemble de pièces servant à produire les ions et à les guider. Un courant d'électrons est produit par un filament, les molécules frappant ces ions se transforment en cation (cette source est appelée EI pour Electron-Impact ou impact électronique en français).

Cas des MS de type triple quadripôles (TQ):

- Mode dit Fullscan (FS): ionisation de l'échantillon en sortie de colonne et analyse de l'ensemble des ions dans une fenêtre donnée (par exemple entre m/z 50 à 650).
- Analyse d'une transition entre un ion parent et un ion fils (MRM) :

Sélection d'un ion au niveau du premier quadripôle Q1, le fragmente en Q2 (chambre de collision) par collision avec un gaz neutre (CID) et sélection au niveau de Q3 d'un ion produit.

- Analyse d'un ion spécifique d'un composé (SIM) :

Sélection d'un ion au niveau de Q1 avant analyse directe.

- Analyse dite SIM-FS :

Sélection d'un ion en Q1 spécifique du composé, puis fragmentation en Q2 avant analyse d'une fenêtre de m/z en Q3 (exemple : sélection d'un m/z = 245 en Q1, fragmentation, visualisation FS entre 50 et 250). Ceci est utile pour le développement de transitions MRM.

Annexe 11 : Liste des transitions MRM développées en GC.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	Compound Name	RT	RT	ST(ms)	Q1 First	Q3 First	Q3	CE	Quantifie
2			Window		Mass	Mass	Resoluti		r Ions
3	01_LACTIC 133 133	7.090	1	11	133	133	2	-10	133
4	01_LACTIC 191 117	7.090	1	11	191	117	2	-10	117
5	01_LACTIC 191 133	7.090	1	11	191	133	2	-10	133
6	01_LACTIC 191 191	7.090	1	11	191	191	2	-5	191
7	02_GLYCOLIC 177 149	7.640	0.5	11	177	149	2	-5	149
8	02_GLYCOLIC 177 177	7.640	0.5	11	177	177	2	-5	177
9	03_3OHPROPIONIC 219 177	9.804	1	8	219	177	2	-5	177
10	03_3OHPROPIONIC 219 219	9.804	1	8	219	219	2	-5	219
11	04_3OH-N-BUTYRI 233 191	10.240	1	8	233	191	2	-5	191
12	04_3OH-N-BUTYRI 233 233	10.240	1	8	233	233	2	-5	233
13	05_3OHISOBUTYRIC 177 133	10.240	1	8	177	133	2	-10	133
14	05_3OHISOBUTYRIC 177 177	10.240	1	8	177	177	2	-5	177
15	05_3OHISOBUTYRIC 233 177	10.240	1	8	233	177	2	-5	177
16	05_3OHISOBUTYRIC 233 233	10.240	1	8	233	233	2	-5	233
17	06_2OHISOVALERIC leucinose 219 133	10.290	0.5	8	219	133	2	-15	133
18	06_2OHISOVALERIC leucinose 219 219	10.290	0.5	8	219	219	2	-5	219
19	07_2METHYL-3OH-BUTYRIC 191 191	11.400	1	3	191	191	2	-5	191
20	07_2METHYL-3OH-BUTYRIC 247 117	11.400	1	3	247	117	2	-10	117
21	07_2METHYL-3OH-BUTYRIC 247 191	11.400	1	3	247	191	2	-5	191
22	07_2METHYL-3OH-BUTYRIC 247 247	11.400	1	3	247	247	2	-5	247
23	08_MALONIC 233 133 test	11.620	0.5	4	233	133	2	-10	133
24	08_MALONIC 233 133 test	11.620	0.5	4	233	133	2	-5	133
25	08_MALONIC 233 133 test	11.620	0.5	4	233	133	2	-15	133
26	08_MALONIC 233 133 test	11.620	0.5	4	233	133	2	-20	133
27	08_MALONIC 233 149	11.620	0.5	3	233	149	2	-10	149
28	08_MALONIC 233 233	11.620	0.5	3	233	233	2	-5	233
29	09_HIVA_FID_lik 131 131	11.760	1	3	131	131	2	-5	131
30	09_HIVA_FID_lik 247 115	11.760	1	3	247	115	2	-10	115
31	09_HIVA_FID_lik 247 131	11.760	1	3	247	131	2	-20	131
32	09_HIVA_FID_lik 247 203	11.760	1	3	247	203	2	-10	203
33	09_HIVA_FID_lik 247 247	11.760	1	3	247	247	2	-5	247
34	10_METHYLMALONI 247 131	11.840	0.5	3	247	131	2	-20	131
35	10_METHYLMALONI 247 203 test	11.840	0.5	4	247	203	2	-20	203
36	10_METHYLMALONI 247 203 test	11.840	0.5	4	247	203	2	-5	203
37	10_METHYLMALONI 247 203 test	11.840	0.5	4	247	203	2	-10	203
38	10_METHYLMALONI 247 203 test	11.840	0.5	4	247	203	2	-15	203
39	10_METHYLMALONI 247 247	11.840	0.5	3	247	247	2	-5	247
40	11_ETHYLHYDRACR 233 177	12.340	0.5	5	233	177	2	-10	177
41	11_ETHYLHYDRACR 233 233	12.340	0.5	5	233	233	2	-5	233
42	11_ETHYLHYDRACR 247 177	12.340	0.5	5	247	177	2	-5	177
43	11_ETHYLHYDRACR 247 247	12.340	0.5	5	247	247	2	-5	247
44	12_2OH ISOCAPROIC 233 103	12.450	0.5	6	233	103	2	-20	103
45	12_2OH ISOCAPROIC 233 233	12.450	0.5	6	233	233	2	-5	233
46	13_4OH-BUTYRIC 233 147	12.640	1	6	233	147	2	-10	147
47	13_4OH-BUTYRIC 233 233	12.640	1	6	233	233	2	-5	233
48	14_2OH3CH3N VALERIC 159 117	12.610	0.5	6	159	117	2	-5	117
49	14_2OH3CH3N VALERIC 159 159	12.610	0.5	6	159	159	2	-5	159
50	14_2OH3CH3N VALERIC 261 233	12.610	0.5	6	261	233	2	-5	233
51	14_2OH3CH3N VALERIC 261 261	12.610	0.5	6	261	261	2	-5	261
52	15_2KETOISOCAPROIC 259 149	12.840	0.5	6	259	149	2	-10	149
53	15_2KETOISOCAPROIC 259 259	12.840	0.5	6	259	259	2	-5	259
54	16_2-METHYLACET 245 171	13.400	0.5	10	245	171	2	-10	171
55	16_2-METHYLACET 245 245	13.400	0.5	10	245	245	2	-5	245
56	17_GLYCEROL 205 117	13.680	0.5	7	205	117	2	-10	117
57	17_GLYCEROL 205 205	13.680	0.5	7	205	205	2	-5	205
58	18_ETHYLMALONIC 261 171	13.890	1	7	261	171	2	-5	171
59	18_ETHYLMALONIC 261 261	13.890	1	7	261	261	2	-5	261
60	19_PHENYLACETIC 193 137	14.360	0.5	7	193	137	2	-15	137
61	19_PHENYLACETIC 193 193	14.360	0.5	7	193	193	2	-15	193
62	20_SUCCINIC 172 112	14.820	0.5	9	172	112	2	-10	112
63	20_SUCCINIC 172 172	14.820	0.5	9	172	172	2	-5	172

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
64	20_SUCCINIC 247 131	14.820	0.5	9	247	131	2	-20	131
65	20_SUCCINIC 247 247	14.820	0.5	9	247	247	2	-5	247
66	21_2-METHYLACETOACETIC 245 171	14.840	1	7	245	171	2	-10	171
67	21_2-METHYLACETOACETIC 245 245	14.840	1	7	245	245	2	-5	245
68	22_GLYCERIC 292 102	15.240	0.5	7	292	102	2	-10	102
69	22_GLYCERIC 292 130	15.240	0.5	7	292	130	2	-5	130
70	22_GLYCERIC 292 292	15.240	0.5	7	292	292	2	-5	292
71	22B_URACIL 241 126	15.440	0.5	6	241	126	2	-10	126
72	22B_URACIL 241 241	15.440	0.5	6	241	241	2	-5	241
73	22B_URACIL 255 241	15.440	0.5	6	255	241	2	-10	241
74	22B_URACIL 255 255	15.440	0.5	6	255	255	2	-5	255
75	23_FUMARIC 245 157	15.901	0.5	5	245	157	2	-10	157
76	23_FUMARIC 245 217	15.901	0.5	5	245	217	2	-5	217
77	23_FUMARIC 245 245	15.901	0.5	5	245	245	2	-5	245
78	24_PROPIO TMS1 188 104	16.170	1	5	188	104	2	-10	104
79	24_PROPIO TMS1 188 132	16.170	1	5	188	132	2	-5	132
80	24_PROPIO TMS1 188 188	16.170	1	5	188	188	2	-5	188
81	24_PROPIO TMS1 188 57	16.170	1	5	188	57	2	-10	57
82	24_PROPIO TMS1 188 75	16.170	1	5	188	75	2	-15	75
83	25_MEVALONOLACTONE 187 159	16.340	0.5	5	187	159	2	-5	159
84	25_MEVALONOLACTONE 187 187	16.340	0.5	5	187	187	2	-5	187
85	26_ISOBUTYRYLGLYCINE 202 104	17.030	0.5	3	202	104	2	-10	104
86	26_ISOBUTYRYLGLYCINE 202 132	17.030	0.5	3	202	132	2	-5	132
87	26_ISOBUTYRYLGLYCINE 202 145	17.030	0.5	3	202	145	2	-5	145
88	26_ISOBUTYRYLGLYCINE 202 202	17.030	0.5	3	202	202	2	-5	202
89	26_ISOBUTYRYLGLYCINE 202 71	17.030	0.5	3	202	71	2	-5	71
90	27_GLUTARIC 158 115	17.375	0.5	3	158	115	2	-10	115
91	27_GLUTARIC 158 130	17.375	0.5	3	158	130	2	-5	130
92	27_GLUTARIC 158 158	17.375	0.5	3	158	158	2	-5	158
93	27_GLUTARIC 261 203	17.375	0.5	3	261	203	2	-5	203
94	27_GLUTARIC 261 233	17.375	0.5	3	261	233	2	-5	233
95	27_GLUTARIC 261 261	17.375	0.5	3	261	261	2	-10	261
96	28_PROPIONYLGLYCINE 260 100 test	17.740	0.5	4	260	100	2	-15	100
97	28_PROPIONYLGLYCINE 260 100 test	17.740	0.5	4	260	100	2	-20	100
98	28_PROPIONYLGLYCINE 260 100 test	17.740	0.5	4	260	100	2	-10	100
99	28_PROPIONYLGLYCINE 260 100 test	17.740	0.5	4	260	100	2	-5	100
100	28_PROPIONYLGLYCINE 260 158	17.740	0.5	4	260	158	2	-15	158
101	28_PROPIONYLGLYCINE 260 260	17.740	0.5	4	260	260	2	-5	260
102	29_3METHYLGLUTARIC 275 117	17.820	0.5	3	275	117	2	-10	117
103	29_3METHYLGLUTARIC 275 130	17.820	0.5	3	275	130	2	-20	130
104	29_3METHYLGLUTARIC 275 159	17.820	0.5	3	275	159	2	-10	159
105	29_3METHYLGLUTARIC 275 275	17.820	0.5	3	275	275	2	-5	275
106	30_N ACETYLLAUCINE 230 116	18.130	0.5	3	230	116	2	-10	116
107	30_N ACETYLLAUCINE 230 148	18.130	0.5	3	230	148	2	-10	148
108	30_N ACETYLLAUCINE 230 230	18.130	0.5	3	230	230	2	-5	230
109	31_3METHYLGLUTACONIC 198 127	19.290	1	2	198	127	2	-10	127
110	31_3METHYLGLUTACONIC 198 142	19.290	1	2	198	142	2	-5	142
111	31_3METHYLGLUTACONIC 198 198	19.290	1	2	198	198	2	-10	198
112	31_3METHYLGLUTACONIC 231 231	19.290	1	2	231	231	2	-5	231
113	31_3METHYLGLUTACONIC 273 183	19.290	1	2	273	183	2	-10	183
114	31_3METHYLGLUTACONIC 273 231	19.290	1	2	273	231	2	-10	231
115	31_3METHYLGLUTACONIC 273 273	19.290	1	2	273	273	2	-5	273
116	32_N BUTYRYLGLYCINE 202 132	18.400	0.5	3	202	132	2	-5	132
117	32_N BUTYRYLGLYCINE 202 145	18.400	0.5	3	202	145	2	-5	145
118	32_N BUTYRYLGLYCINE 202 202	18.400	0.5	3	202	202	2	-5	202
119	33_2MBG 1TMS 216 132	19.110	0.5	3	216	132	2	-5	132
120	33_2MBG 1TMS 216 216	19.110	0.5	3	216	216	2	-5	216
121	33_2MBG 1TMS 216 85	19.110	1	2	216	85	2	-10	85
122	34_MALIC 233 189	19.430	0.5	2	233	189	2	-5	189
123	34_MALIC 233 233	19.430	0.5	2	233	233	2	-5	233
124	34_MALIC 245 217	19.430	0.5	2	245	217	2	-10	217
125	34_MALIC 245 245	19.430	0.5	2	245	245	2	-5	245
126	35_2MBG 2TMS 288 170	19.460	0.5	2	288	170	2	-10	170

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
127	36_ISOVAL 1TMS 216 104	19.540	0.5	2	216	104	2	-10	104
128	36_ISOVAL 1TMS 216 132	19.540	0.5	2	216	132	2	-5	132
129	36_ISOVAL 1TMS 216 216	19.540	0.5	2	216	216	2	-5	216
130	37 ADIPIC 275 159	19.904	0.5	2	275	159	2	-10	159
131	37 ADIPIC 275 185	19.904	0.5	2	275	185	2	-5	185
132	37 ADIPIC 275 275	19.904	0.5	2	275	275	2	-5	275
133	37_ADIPIC 275 111	19.904	0.5	2	275	111	2	-10	111
134	37_ADIPIC 275 141	19.904	0.5	2	275	141	2	-10	141
135	38_ISOVALERYLG 2TMS 288 176	19.950	0.5	2	288	176	2	-10	176
136	38_ISOVALERYLG 2TMS 288 288	19.950	0.5	2	288	288	2	-5	288
137	39_PYROGLUTAMIC 156 156	20.201	0.5	4	156	156	2	-5	156
138	39_PYROGLUTAMIC 258 230	20.201	0.5	4	258	230	2	-10	230
139	39_PYROGLUTAMIC 258 258	20.201	0.5	4	258	258	2	-5	258
140	41_ERYTHRONIC 292 102	20.640	0.5	7	292	102	2	-10	102
141	41_ERYTHRONIC 292 130	20.640	0.5	7	292	130	2	-10	130
142	41_ERYTHRONIC 292 292	20.640	0.5	7	292	292	2	-5	292
143	42_TIGLYLG TMS2 286 227	21.160	0.5	3	286	227	2	-10	227
144	42_TIGLYLG TMS2 286 286	21.160	0.5	3	286	286	2	-5	286
145	42_TIGLYLG TMS2 301 142	21.160	0.5	3	301	142	2	-10	142
146	42_TIGLYLG TMS2 301 161	21.160	0.5	3	301	161	2	-10	161
147	42_TIGLYLG TMS2 301 301	21.160	0.5	3	301	301	2	-5	301
148	43_3METHYLCROTONYLGLYCINE TMS2 286 168	21.380	0.5	3	286	168	2	-10	168
149	43_3METHYLCROTONYLGLYCINE TMS2 286 242	21.380	0.5	3	286	242	2	-10	242
150	43_3METHYLCROTONYLGLYCINE TMS2 286 258	21.380	0.5	3	286	258	2	-5	258
151	43_3METHYLCROTONYLGLYCINE TMS2 286 286	21.380	0.5	3	286	286	2	-5	286
152	43_3METHYLCROTONYLGLYCINE TMS2 301 156	21.380	0.5	3	301	156	2	-10	156
153	43_3METHYLCROTONYLGLYCINE TMS2 301 168	21.380	0.5	3	301	168	2	-10	168
154	43_3METHYLCROTONYLGLYCINE TMS2 301 211	21.380	0.5	3	301	211	2	-10	211
155	43_3METHYLCROTONYLGLYCINE TMS2 301 286	21.380	0.5	3	301	286	2	-10	286
156	43_3METHYLCROTONYLGLYCINE TMS2 301 301	21.380	0.5	3	301	301	2	-5	301
157	44_2OHGLUTARIC 247 129	21.520	0.5	3	247	129	2	-10	129
158	44_2OHGLUTARIC 247 247	21.520	0.5	3	247	247	2	-5	247
159	44_2OHGLUTARIC 349 203	21.520	0.5	3	349	203	2	-10	203
160	44_2OHGLUTARIC 349 231	21.520	0.5	3	349	231	2	-5	231
161	44_2OHGLUTARIC 349 349	21.520	0.5	3	349	349	2	-5	349
162	46_3METHYLCROTONYLG 229 139	21.370	0.5	3	229	139	2	-5	139
163	46_3METHYLCROTONYLG 229 170	21.370	0.5	3	229	170	2	-10	170
164	46_3METHYLCROTONYLG 229 229	21.370	0.5	3	229	229	2	-5	229
165	46_3METHYLCROTONYLG 229 83	21.370	0.5	3	229	83	2	-10	83
166	47 TIGLYLG TMS1 229 111	21.440	0.5	3	229	111	2	-10	111
167	47 TIGLYLG TMS1 229 139	21.440	0.5	3	229	139	2	-5	139
168	47 TIGLYLG TMS1 229 170	21.440	0.5	3	229	170	2	-10	170
169	47 TIGLYLG TMS1 229 229	21.440	0.5	3	229	229	2	-5	229
170	48_HMG_3OH-3CH3 363 183	22.133	0.5	4	363	183	2	-15	183
171	48_HMG_3OH-3CH3 363 199	22.133	0.5	4	363	199	2	-10	199
172	48_HMG_3OH-3CH3 363 273	22.133	0.5	4	363	273	2	-10	273
173	48_HMG_3OH-3CH3 363 363	22.133	0.5	4	363	363	2	-5	363
174	49_PIMELIC 289 125	22.190	0.5	4	289	125	2	-10	125
175	49_PIMELIC 289 155	22.190	0.5	4	289	155	2	-10	155
176	49_PIMELIC 289 289	22.190	0.5	4	289	289	2	-5	289
177	50_2-CETOGLUTAR 347 157	22.311	0.5	4	347	157	2	-10	157
178	50_2-CETOGLUTAR 347 291	22.311	0.5	4	347	291	2	-10	291
179	50_2-CETOGLUTAR 347 319	22.311	0.5	4	347	319	2	-10	319
180	50_2-CETOGLUTAR 347 347	22.311	0.5	4	347	347	2	-5	347
181	51_T2 P2 SA 287 169	22.190	1	4	287	169	2	-10	169
182	51_T2 P2 SA 287 287	22.190	1	4	287	287	2	-5	287
183	52_4OHPHENYLACE 252 164	23.000	0.5	3	252	164	2	-10	164
184	52_4OHPHENYLACE 252 179	23.000	0.5	3	252	179	2	-10	179
185	52_4OHPHENYLACE 252 252	23.000	0.5	3	252	252	2	-5	252
186	52_4OHPHENYLACE 296 164	23.000	0.5	3	296	164	2	-10	164
187	52_4OHPHENYLACE 296 179	23.000	0.5	3	296	179	2	-15	179
188	52_4OHPHENYLACE 296 252	23.000	0.5	3	296	252	2	-5	252
189	52_4OHPHENYLACE 296 296	23.000	0.5	3	296	296	2	-5	296

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
190	53_HEXANOYLG1 230 104	23.020	0.5	3	230	104	2	-10	104
191	53_HEXANOYLG1 230 230	23.020	0.5	3	230	230	2	-5	230
192	53_HEXANOYLG1 230 99	23.020	0.5	3	230	99	2	-10	99
193	54_HEXANOYLG2 261 171	23.160	0.5	3	261	171	2	-5	171
194	54_HEXANOYLG2 261 261	23.160	0.5	3	261	261	2	-5	261
195	54_HEXANOYLG2 274 176	23.160	0.5	3	274	176	2	-10	176
196	54_HEXANOYLG2 274 274	23.160	0.5	3	274	274	2	-5	274
197	55_NACETYLASP 304 116	23.360	0.5	3	304	116	2	-15	116
198	55_NACETYLASP 304 144	23.360	0.5	3	304	144	2	-15	144
199	55_NACETYLASP 304 186	23.360	0.5	3	304	186	2	-10	186
200	55_NACETYLASP 304 217	23.360	0.5	3	304	217	2	-10	217
201	55_NACETYLASP 304 245	23.360	1	3	304	245	2	-10	245
202	55_NACETYLASP 304 276	23.360	0.5	3	304	276	2	-5	276
203	55_NACETYLASP 304 304	23.360	0.5	3	304	304	2	-5	304
204	56_T2 P3 SA 169 116	23.440	1	3	169	116	2	-10	116
205	56_T2 P3 SA 169 169	23.440	1	3	169	169	2	-5	169
206	56_T2 P3 SA 287 169	23.440	1	3	287	169	2	-10	169
207	56_T2 P3 SA 287 287	23.440	1	3	287	287	2	-5	287
208	57_SUBERIC 303 109	24.340	0.5	7	303	109	2	-10	109
209	57_SUBERIC 303 169	24.340	0.5	7	303	169	2	-10	169
210	57_SUBERIC 303 210	24.340	0.5	7	303	210	2	-5	210
211	57_SUBERIC 303 303	24.340	0.5	7	303	303	2	-5	303
212	58_OROTIC 254 201	25.270	0.5	7	254	201	2	-10	201
213	58_OROTIC 254 254	25.270	0.5	7	254	254	2	-5	254
214	58_OROTIC 357 269	25.270	0.5	7	357	269	2	-15	269
215	58_OROTIC 357 357	25.270	0.5	7	357	357	2	-5	357
216	59_CISACONITIC 375 211	25.400	0.5	7	375	211	2	-5	211
217	59_CISACONITIC 375 285	25.400	0.5	7	375	285	2	-10	285
218	59_CISACONITIC 375 375	25.400	0.5	7	375	375	2	-5	375
219	60_HOMOGENITISIC 237 163	27.120	0.5	4	237	163	2	-20	163
220	60_HOMOGENITISIC 237 237	27.120	0.5	4	237	237	2	-5	237
221	60_HOMOGENITISIC 252 163	27.120	0.5	4	252	163	2	-15	163
222	60_HOMOGENITISIC 252 252	27.120	0.5	4	252	252	2	-5	252
223	61_MC 2pics 479.5 225	27.160	0.5	4	479.5	225	2	-15	225
224	61_MC 2pics 479.5 288	27.160	0.5	4	479.5	288	2	-10	288
225	61_MC 2pics 479.5 389	27.160	0.5	4	479.5	389	2	-10	389
226	61_MC 2pics 479.5 479.5	27.160	0.5	4	479.5	479.5	2	-5	479.5
227	62_CIS 4 DECENE 119 119	27.740	0.5	11	119	119	2	-5	119
228	62_CIS 4 DECENE 164 119	27.740	0.5	11	164	119	2	-10	119
229	62_CIS 4 DECENE 164 164	27.740	0.5	11	164	164	2	-5	164
230	63_SEBACIC 331 137	28.380	0.5	7	331	137	2	-10	137
231	63_SEBACIC 331 149	28.380	0.5	7	331	149	2	-10	149
232	63_SEBACIC 331 331	28.380	0.5	7	331	331	2	-5	331
233	64_4OHPHENYLLAC 293 219	28.390	0.5	7	293	219	2	-15	219
234	64_4OHPHENYLLAC 293 249	28.390	0.5	7	293	249	2	-10	249
235	64_4OHPHENYLLAC 293 293	28.390	0.5	7	293	293	2	-5	293
236	64_4OHPHENYLLAC 308 179	28.390	0.5	7	308	179	2	-10	179
237	64_4OHPHENYLLAC 308 180	28.390	0.5	7	308	180	2	-10	180
238	64_4OHPHENYLLAC 308 293	28.390	0.5	7	308	293	2	-10	293
239	64_4OHPHENYLLAC 308 308	28.390	0.5	7	308	308	2	-5	308
240	65_VANILLACTIC 338 323	30.690	0.5	10	338	323	2	-10	323
241	65_VANILLACTIC 338 338	30.690	0.5	10	338	338	2	-5	338
242	65_VANILLACTIC 428 209	30.690	0.5	10	428	209	2	-20	209
243	65_VANILLACTIC 428 338	30.690	0.5	10	428	338	2	-10	338
244	65_VANILLACTIC 428 428	30.690	0.5	10	428	428	2	-5	428
245	66_4OHPHENYLPYRUVIC 381 325	31.240	0.5	5	381	325	2	-10	325
246	66_4OHPHENYLPYRUVIC 381 381	31.240	0.5	5	381	381	2	-5	381
247	66_4OHPHENYLPYRUVIC 396 381	31.240	0.5	5	396	381	2	-10	381
248	66_4OHPHENYLPYRUVIC 396 396	31.240	0.5	5	396	396	2	-5	396
249	67_3OH SEBACIC 419 165	31.610	0.5	5	419	165	2	-5	165
250	67_3OH SEBACIC 419 287	31.610	0.5	5	419	287	2	-10	287
251	67_3OH SEBACIC 419 329	31.610	0.5	5	419	329	2	-5	329
252	67_3OH SEBACIC 419 377	31.610	0.5	5	419	377	2	-10	377

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
253	67 3OH SEBACIC 419 419	31.610	0.5	5	419	419	2	-5	419
254	68 ETALON INTERNE 327 131	33.070	0.5	9	327	131	2	-10	131
255	68 ETALON INTERNE 327 327	33.070	0.5	9	327	327	2	-5	327
256	69 VANILPYRUVIC 355 325	33.760	0.5	7	355	325	2	-10	325
257	69 VANILPYRUVIC 355 355	33.760	0.5	7	355	355	2	-5	355
258	69 VANILPYRUVIC 411 221	33.760	0.5	7	411	221	2	-10	221
259	69 VANILPYRUVIC 411 355	33.760	0.5	7	411	355	2	-10	355
260	69 VANILPYRUVIC 411 411	33.760	0.5	7	411	411	2	-5	411
261	69 VANILPYRUVIC 426 355	33.760	0.5	7	426	355	2	-15	355
262	69 VANILPYRUVIC 426 411	33.760	0.5	7	426	411	2	-10	411
263	69 VANILPYRUVIC 426 426	33.760	0.5	7	426	426	2	-5	426
264	70 3OHDODECANEDIOIC 405 315	34.950	0.5	10	405	315	2	-10	315
265	70 3OHDODECANEDIOIC 405 405	34.950	0.5	10	405	405	2	-5	405
266	70 3OHDODECANEDIOIC 447 405	34.950	0.5	10	447	405	2	-10	405
267	70 3OHDODECANEDIOIC 447 447	34.950	0.5	10	447	447	2	-5	447
268	71 SUBERYLG 360 139	35.180	0.5	10	360	139	2	-10	139
269	71 SUBERYLG 360 242	35.180	0.5	10	360	242	2	-10	242
270	71 SUBERYLG 360 270	35.180	0.5	10	360	270	2	-15	270
271	71 SUBERYLG 360 360	35.180	0.5	10	360	360	2	-5	360
272	72 ION 201 EPOXYC14 201 111	36.640	0.5	25	201	111	2	-10	111
273	72 ION 201 EPOXYC14 201 201	36.640	0.5	25	201	201	2	-5	201
274	72 ION 201 EPOXYC14 293 264	36.640	0.5	25	293	264	2	-10	264
275	72 ION 201 EPOXYC14 293 293	36.640	0.5	25	293	293	2	-5	293
276	X_2.5FURANDICARBO 285 197	23.170	0.5	3	285	197	2	-10	197
277	X_2.5FURANDICARBO 285 241	23.170	0.5	3	285	241	2	-5	241
278	X_2.5FURANDICARBO 285 285	23.170	0.5	3	285	285	2	-5	285
279	X_2AMINO BENZOIC 266 118	22.360	0.5	4	266	118	2	-10	118
280	X_2AMINO BENZOIC 266 133	22.360	0.5	4	266	133	2	-20	133
281	X_2AMINO BENZOIC 266 192	22.360	0.5	4	266	192	2	-15	192
282	X_2AMINO BENZOIC 266 266	22.360	0.5	4	266	266	2	-5	266
283	X_2oh adipic 261 171	23.690	0.5	4	261	171	2	-5	171
284	X_2oh adipic 261 261	23.690	0.5	4	261	261	2	-5	261
285	X_2oh adipic 363 203	23.690	0.5	4	363	203	2	-10	203
286	X_2oh adipic 363 245	23.690	0.5	4	363	245	2	-10	245
287	X_2oh adipic 363 363	23.690	0.5	4	363	363	2	-5	363
288	X_2OH ISOBUTYRIC 205 149	7.290	0.5	11	205	149	2	-15	149
289	X_2OH ISOBUTYRIC 205 167	7.290	0.5	11	205	167	2	-10	167
290	X_2OH ISOBUTYRIC 205 205	7.290	0.5	11	205	205	2	-5	205
291	X_2OH SEBACIC 317 109	31.370	0.5	5	317	109	2	-10	109
292	X_2OH SEBACIC 317 155	31.370	0.5	5	317	155	2	-10	155
293	X_2OH SEBACIC 317 227	31.370	0.5	5	317	227	2	-5	227
294	X_2OH SEBACIC 317 317	31.370	0.5	5	317	317	2	-5	317
295	X_2OH SEBACIC 391 155	31.370	0.5	5	391	155	2	-10	155
296	X_2OH SEBACIC 391 391	31.370	0.5	5	391	391	2	-5	391
297	X_2OH-BUTYRIC 131 131	9.250	0.5	9	131	131	2	-5	131
298	X_2OH-BUTYRIC 131 73	9.250	0.5	9	131	73	2	-10	73
299	X_2OH-BUTYRIC 205 130	9.250	0.5	9	205	130	2	-20	130
300	X_2OH-BUTYRIC 205 131	9.250	0.5	9	205	131	2	-20	131
301	X_2OH-BUTYRIC 205 205	9.250	0.5	9	205	205	2	-5	205
302	X_2OH-BUTYRIC 233 131	9.250	0.5	9	233	131	2	-20	131
303	X_2OH-BUTYRIC 233 233	9.250	0.5	9	233	233	2	-5	233
304	X_2OH-TOLUENE 180 165	10.090	0.5	8	180	165	2	-10	165
305	X_2OH-TOLUENE 180 180	10.090	0.5	8	180	180	2	-5	180
306	X_3 CETOVALERIC 231 163	14.040	0.5	7	231	163	2	-5	163
307	X_3 CETOVALERIC 231 231	14.040	0.5	7	231	231	2	-5	231
308	X_3 CETOVALERIC 245 171	14.040	0.5	7	245	171	2	-10	171
309	X_3 CETOVALERIC 245 245	14.040	0.5	7	245	245	2	-5	245
310	X_3 CETOVALERIC 260 170	14.040	0.5	7	260	170	2	-5	170
311	X_3 CETOVALERIC 260 231	14.040	0.5	7	260	231	2	-5	231
312	X_3 CETOVALERIC 260 260	14.040	0.5	7	260	260	2	-5	260
313	X_3 INDOLELATIC 421 202	33.460	0.5	7	421	202	2	-10	202
314	X_3 INDOLELATIC 421 292	33.460	0.5	7	421	292	2	-10	292
315	X_3 INDOLELATIC 421 331	33.460	0.5	7	421	331	2	-10	331

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
316	X_3 INDOLELATIC 421 421	33.460	0.5	7	421	421	2	-5	421
317	X_3METHYL ADIPIC 289 125	20.550	0.5	7	289	125	2	-10	125
318	X_3METHYL ADIPIC 289 155	20.550	0.5	7	289	155	2	-5	155
319	X_3METHYL ADIPIC 289 173	20.550	0.5	7	289	173	2	-5	173
320	X_3METHYL ADIPIC 289 289	20.550	0.5	7	289	289	2	-5	289
321	X_3-METHYLGLUTACONIC 345 183	24.230	0.5	7	345	183	2	-10	183
322	X_3-METHYLGLUTACONIC 345 271	24.230	0.5	7	345	271	2	-10	271
323	X_3-METHYLGLUTACONIC 345 345	24.230	0.5	7	345	345	2	-5	345
324	X_3-METHYLGLUTACONIC 360 170	24.230	0.5	7	360	170	2	-10	170
325	X_3-METHYLGLUTACONIC 360 229	24.230	0.5	7	360	229	2	-10	229
326	X_3-METHYLGLUTACONIC 360 360	24.230	0.5	7	360	360	2	-5	360
327	X_3MG 2TMS 198 170	18.160	0.5	3	198	170	2	-5	170
328	X_3MG 2TMS 198 198	18.160	0.5	3	198	198	2	-5	198
329	X_3MG 2TMS 273 109	18.160	0.5	3	273	109	2	-10	109
330	X_3MG 2TMS 273 183	18.160	0.5	3	273	183	2	-10	183
331	X_3MG 2TMS 273 273	18.160	0.5	3	273	273	2	-5	273
332	X_3OH ADIPIC 363 109	23.940	0.5	7	363	109	2	-10	109
333	X_3OH ADIPIC 363 149	23.940	0.5	7	363	149	2	-10	149
334	X_3OH ADIPIC 363 363	23.940	0.5	7	363	363	2	-5	363
335	X_3OH CAPROIC 261 169	14.640	0.5	9	261	169	2	-5	169
336	X_3OH CAPROIC 261 185	14.640	0.5	9	261	185	2	-10	185
337	X_3OH CAPROIC 261 261	14.640	0.5	9	261	261	2	-5	261
338	X_3OH HYPPURIC 294 191	33.190	0.5	9	294	191	2	-10	191
339	X_3OH HYPPURIC 294 278	33.190	0.5	9	294	278	2	-15	278
340	X_3OH HYPPURIC 294 294	33.190	0.5	9	294	294	2	-5	294
341	X_3OH HYPPURIC 339 294	33.190	0.5	9	339	294	2	-10	294
342	X_3OH HYPPURIC 339 339	33.190	0.5	9	339	339	2	-5	339
343	X_3OH ISO VALERIC 247 117	11.340	0.5	3	247	117	2	-10	117
344	X_3OH ISO VALERIC 247 157	11.340	0.5	3	247	157	2	-10	157
345	X_3OH ISO VALERIC 247 191	11.340	0.5	3	247	191	2	-10	191
346	X_3OH ISO VALERIC 247 247	11.340	0.5	3	247	247	2	-5	247
347	X_4 METHYLCATECHOL 268 180	16.770	0.5	6	268	180	2	-10	180
348	X_4 METHYLCATECHOL 268 253	16.770	0.5	6	268	253	2	-5	253
349	X_4 METHYLCATECHOL 268 268	16.770	0.5	6	268	268	2	-5	268
350	X_4OH HYPPURIC 339 193	34.590	0.5	10	339	193	2	-20	193
351	X_4OH HYPPURIC 339 294	34.590	0.5	10	339	294	2	-10	294
352	X_4OH HYPPURIC 339 339	34.590	0.5	10	339	339	2	-5	339
353	X_5OH HEXANOIC 261 171	15.960	0.5	5	261	171	2	-5	171
354	X_5OH HEXANOIC 261 204	15.960	0.5	5	261	204	2	-10	204
355	X_5OH HEXANOIC 261 261	15.960	0.5	5	261	261	2	-5	261
356	X_5OH N VALERIC 247 157	15.340	0.5	7	247	157	2	-5	157
357	X_5OH N VALERIC 247 247	15.340	0.5	7	247	247	2	-5	247
358	X_ACETOACETIC 231 157	11.510	0.5	3	231	157	2	-10	157
359	X_ACETOACETIC 231 231	11.510	0.5	3	231	231	2	-5	231
360	X_ASCORBIC 332 215	29.320	0.5	14	332	215	2	-15	215
361	X_ASCORBIC 332 259	29.320	0.5	14	332	259	2	-10	259
362	X_ASCORBIC 332 304	29.320	0.5	14	332	304	2	-10	304
363	X_ASCORBIC 332 332	29.320	0.5	14	332	332	2	-5	332
364	X_AZELAIC 317 225	26.410	0.5	14	317	225	2	-5	225
365	X_AZELAIC 317 274	26.410	0.5	14	317	274	2	-5	274
366	X_AZELAIC 317 317	26.410	0.5	14	317	317	2	-5	317
367	X_BenzaAc 384 237	26.980	0.5	4	384	237	2	-15	237
368	X_BenzaAc 384 267	26.980	0.5	4	384	267	2	-15	267
369	X_BenzaAc 384 341	26.980	0.5	4	384	341	2	-10	341
370	X_BenzaAc 384 384	26.980	0.5	4	384	384	2	-5	384
371	X_BENZOIC 179 105	12.970	0.5	6	179	105	2	-10	105
372	X_BENZOIC 179 135	12.970	0.5	6	179	135	2	-10	135
373	X_BENZOIC 179 179	12.970	0.5	6	179	179	2	-5	179
374	X_CITRIC 273 229	26.740	1	4	273	229	2	-10	229
375	X_CITRIC 273 273	26.740	1	4	273	273	2	-5	273
376	X_DIHYDROTHYMINE TMS2 NIST 257 109	18.540	1	3	257	109	2	-10	109
377	X_DIHYDROTHYMINE TMS2 NIST 257 201	18.540	1	3	257	201	2	-10	201
378	X_DIHYDROTHYMINE TMS2 NIST 257 257	18.540	1	3	257	257	2	-5	257

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
379	X_DIHYDROTHYMINE TMS2 NIST 271 109	18.540	1	3	271	109	2	-10	109
380	X_DIHYDROTHYMINE TMS2 NIST 271 201	18.540	1	3	271	201	2	-10	201
381	X_DIHYDROTHYMINE TMS2 NIST 271 214	18.540	1	3	271	214	2	-10	214
382	X_DIHYDROTHYMINE TMS2 NIST 271 271	18.540	1	3	271	271	2	-5	271
383	X_DIHYDROURACIL TMS2 201 104	19.300	1	2	201	104	2	-10	104
384	X_DIHYDROURACIL TMS2 201 132	19.300	1	2	201	132	2	-10	132
385	X_DIHYDROURACIL TMS2 201 201	19.300	1	2	201	201	2	-5	201
386	X_DIHYDROURACIL TMS2 243 167	19.300	1	2	243	167	2	-10	167
387	X_DIHYDROURACIL TMS2 243 201	19.300	1	2	243	201	2	-10	201
388	X_DIHYDROURACIL TMS2 243 243	19.300	1	2	243	243	2	-5	243
389	X_DIHYDROURACIL TMS2 257 167	19.300	1	2	257	167	2	-10	167
390	X_DIHYDROURACIL TMS2 257 241	19.300	1	2	257	241	2	-10	241
391	X_DIHYDROURACIL TMS2 257 257	19.300	1	2	257	257	2	-5	257
392	X_ERYTRITOL 293 159	19.840	0.5	2	293	159	2	-10	159
393	X_ERYTRITOL 293 293	19.840	0.5	2	293	293	2	-5	293
394	X_ERYTRITOL 307 159	19.840	0.5	2	307	159	2	-10	159
395	X_ERYTRITOL 307 307	19.840	0.5	2	307	307	2	-5	307
396	X_FERULIC 338 279	32.180	0.5	20	338	279	2	-10	279
397	X_FERULIC 338 293	32.180	0.5	20	338	293	2	-15	293
398	X_FERULIC 338 308	32.180	0.5	20	338	308	2	-10	308
399	X_FERULIC 338 323	32.180	0.5	20	338	323	2	-10	323
400	X_FERULIC 338 338	32.180	0.5	20	338	338	2	-5	338
401	X_HIAA 290 202	34.340	0.5	10	290	202	2	-15	202
402	X_HIAA 290 290	34.340	0.5	10	290	290	2	-5	290
403	X_HIAA 407 290	34.340	0.5	10	407	290	2	-20	290
404	X_HOMOVANILLIC 326 179	25.830	0.5	7	326	179	2	-20	179
405	X_HOMOVANILLIC 326 209	25.830	0.5	7	326	209	2	-15	209
406	X_HOMOVANILLIC 326 267	25.830	0.5	7	326	267	2	-10	267
407	X_HOMOVANILLIC 326 296	25.830	0.5	7	326	296	2	-10	296
408	X_HOMOVANILLIC 326 326	25.830	0.5	7	326	326	2	-5	326
409	X_INDOLE3ACETIC DITMS 319 202	29.680	0.5	16	319	202	2	-15	202
410	X_INDOLE3ACETIC DITMS 319 319	29.680	0.5	16	319	319	2	-5	319
411	X_ION 287 PHTALATE 287 123	21.640	0.5	3	287	123	2	-10	123
412	X_ION 287 PHTALATE 287 153	21.640	0.5	3	287	153	2	-5	153
413	X_ION 287 PHTALATE 287 197	21.640	0.5	3	287	197	2	-5	197
414	X_ION 287 PHTALATE 287 287	21.640	0.5	3	287	287	2	-5	287
415	X_ION 303 185	34.140	1	7	303	185	2	-10	185
416	X_ION 303 303	34.140	1	7	303	303	2	-5	303
417	X_ION 306 101	16.440	1	5	306	101	2	-15	101
418	X_ION 306 115	16.440	1	5	306	115	2	-10	115
419	X_ION 306 306	16.440	1	5	306	306	2	-5	306
420	X_ION 331 172	29.140	0.5	14	331	172	2	-10	172
421	X_ION 331 188	29.140	0.5	14	331	188	2	-10	188
422	X_ION 331 331	29.140	0.5	14	331	331	2	-5	331
423	X_ISOCITRIC 273 245	26.836	1	4	273	245	2	-10	245
424	X_ISOCITRIC 273 273	26.836	1	4	273	273	2	-5	273
425	X_METHYLSUCC 261 149	15.150	0.5	7	261	149	2	-5	149
426	X_METHYLSUCC 261 261	15.150	0.5	7	261	261	2	-5	261
427	X_OCTANOIC 201 131	13.450	0.5	10	201	131	2	-5	131
428	X_OCTANOIC 201 201	13.450	0.5	10	201	201	2	-5	201
429	X_OH CINNAMIC 267 179	27.440	0.5	4	267	179	2	-10	179
430	X_OH CINNAMIC 267 193	27.440	0.5	4	267	193	2	-10	193
431	X_OH CINNAMIC 267 267	27.440	0.5	4	267	267	2	-5	267
432	X_OH CINNAMIC 398 267	27.440	0.5	4	398	267	2	-15	267
433	X_OH CINNAMIC 398 280	27.440	0.5	4	398	280	2	-10	280
434	X_OH CINNAMIC 398 398	27.440	0.5	4	398	398	2	-5	398
435	X_OXALIC 190 133	9.530	0.5	9	190	133	2	-10	133
436	X_OXALIC 190 190	9.530	0.5	9	190	190	2	-5	190
437	X_PALMITIC 313 131	31.320	0.5	5	313	131	2	-10	131
438	X_PALMITIC 313 313	31.320	0.5	5	313	313	2	-5	313
439	X_PANTHOTENIC 291 159	30.190	0.5	10	291	159	2	-10	159
440	X_PANTHOTENIC 291 201	30.190	0.5	10	291	201	2	-5	201
441	X_PANTHOTENIC 291 291	30.190	0.5	10	291	291	2	-5	291

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
442	X_PANTHOTENIC 420 159	30.190	0.5	10	420	159	2	-15	159
443	X_PANTHOTENIC 420 420	30.190	0.5	10	420	420	2	-5	420
444	X_PYRUVIC 217 167	8.040	0.5	20	217	167	2	-10	167
445	X_PYRUVIC 217 189	8.040	0.5	20	217	189	2	-5	189
446	X_PYRUVIC 217 217	8.040	0.5	20	217	217	2	-5	217
447	X_STEARIC 341 131	34.830	0.5	10	341	131	2	-10	131
448	X_STEARIC 341 341	34.830	0.5	10	341	341	2	-5	341
449	X_THYMINE 270 239	17.110	0.5	3	270	239	2	-10	239
450	X_THYMINE 270 255	17.110	0.5	3	270	255	2	-10	255
451	X_THYMINE 270 270	17.110	0.5	3	270	270	2	-5	270
452	X_VANILLIC 297 181	25.700	0.5	7	297	181	2	-10	181
453	X_VANILLIC 297 297	25.700	0.5	7	297	297	2	-5	297
454	X_VANILLIC 312 267	25.700	0.5	7	312	267	2	-15	267
455	X_VANILLIC 312 282	25.700	0.5	7	312	282	2	-10	282
456	X_VANILLIC 312 297	25.700	0.5	7	312	297	2	-10	297
457	X_VANILLIC 312 312	25.700	0.5	7	312	312	2	-5	312
458	X_VANILMANDELIC 297 194	28.010	0.5	7	297	194	2	-15	194
459	X_VANILMANDELIC 297 223	28.010	0.5	7	297	223	2	-10	223
460	X_VANILMANDELIC 297 297	28.010	0.5	7	297	297	2	-5	297
461	Z_09_HIVA_FID_lik 249 117	11.805	1	3	249	117	2	-5	117
462	Z_09_HIVA_FID_lik 249 249	11.805	1	3	249	249	2	-5	249
463	Z_10_METHYLMALONI 251 133	11.840	0.5	3	251	133	2	-20	133
464	Z_10_METHYLMALONI 251 206	11.840	0.5	3	251	206	2	-5	206
465	Z_10_METHYLMALONI 251 251	11.840	0.5	3	251	251	2	-5	251
466	Z_15_2KETOISOCAPROIC 265 176	12.840	0.5	6	265	176	2	-5	176
467	Z_15_2KETOISOCAPROIC 265 265	12.840	0.5	6	265	265	2	-5	265
468	Z_18_ETHYLMALONIC 264 174	13.890	1	7	264	174	2	-10	174
469	Z_18_ETHYLMALONIC 264 264	13.890	1	7	264	264	2	-5	264
470	Z_25 MEVALONOLACTONE 191 161	16.340	0.5	5	191	161	2	-10	161
471	Z_25 MEVALONOLACTONE 191 191	16.340	0.5	5	191	191	2	-5	191
472	Z_27_GLUTARIC 161 118	17.375	0.5	3	161	118	2	-10	118
473	Z_27_GLUTARIC 161 161	17.375	0.5	3	161	161	2	-5	161
474	Z_27_GLUTARIC 265 205	17.375	0.5	3	265	205	2	-10	205
475	Z_27_GLUTARIC 265 265	17.375	0.5	3	265	265	2	-5	265
476	Z_31_3METHYLGLUTACONIC 201 129	19.290	1	2	201	129	2	-10	129
477	Z_31_3METHYLGLUTACONIC 201 201	19.290	1	2	201	201	2	-5	201
478	Z_31_3METHYLGLUTACONIC 276 186	19.290	1	2	276	186	2	-10	186
479	Z_31_3METHYLGLUTACONIC 276 276	19.290	1	2	276	276	2	-5	276
480	Z_36_ISOVAL 1TMS 219 135	19.540	0.5	2	219	135	2	-5	135
481	Z_36_ISOVAL 1TMS 219 219	19.540	0.5	2	219	219	2	-5	219
482	Z_37_ADIPIC 281 117	19.904	0.5	2	281	117	2	-10	117
483	Z_37_ADIPIC 281 163	19.904	0.5	2	281	163	2	-10	163
484	Z_37_ADIPIC 281 191	19.904	0.5	2	281	191	2	-5	191
485	Z_37_ADIPIC 281 281	19.904	0.5	2	281	281	2	-5	281
486	Z_40_ETALON INTERNE 203 203	20.368	0.5	4	203	203	2	-5	203
487	Z_40_ETALON INTERNE 221 203	20.368	0.5	4	221	203	2	-5	203
488	Z_40_ETALON INTERNE 221 221	20.368	0.5	4	221	221	2	-5	221
489	Z_44_2OHGLUTARIC 250 131	21.520	0.5	3	250	131	2	-10	131
490	Z_44_2OHGLUTARIC 250 250	21.520	0.5	3	250	250	2	-5	250
491	Z_50_2-CETOGLUTAR 351 161	22.311	0.5	4	351	161	2	-10	161
492	Z_50_2-CETOGLUTAR 351 294	22.311	0.5	4	351	294	2	-5	294
493	Z_50_2-CETOGLUTAR 351 322	22.311	0.5	4	351	322	2	-5	322
494	Z_50_2-CETOGLUTAR 351 351	22.311	0.5	4	351	351	2	-5	351
495	Z_53_HEXANOYLG1 232 106	23.020	0.5	3	232	106	2	-10	106
496	Z_53_HEXANOYLG1 232 232	23.020	0.5	3	232	232	2	-5	232
497	Z_6 HH D10 180 132	17.740	1	3	180	132	2	-10	132
498	Z_6 HH D10 180 148	17.740	1	3	180	148	2	-10	148
499	Z_6 HH D10 180 180	17.740	1	3	180	180	2	-5	180
500	Z_6 HH D10 254 150	17.740	1	3	254	150	2	-10	150
501	Z_6 HH D10 254 206	17.740	1	3	254	206	2	-5	206
502	Z_6 HH D10 254 254	17.740	1	3	254	254	2	-5	254
503	Z_6 HH D10 271 180	17.740	1	3	271	180	2	-10	180
504	Z_6 HH D10 271 271	17.740	1	3	271	271	2	-5	271

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
505	Z_61_MC 2pics 482 228	27.160	0.5	4	482	228	2	-10	228
506	Z_61_MC 2pics 482 392	27.160	0.5	4	482	392	2	-5	392
507	Z_61_MC 2pics 482 482	27.160	0.5	4	482	482	2	-5	482

Annexe 12 : Liste des transitions MRM développées en fluxomique.

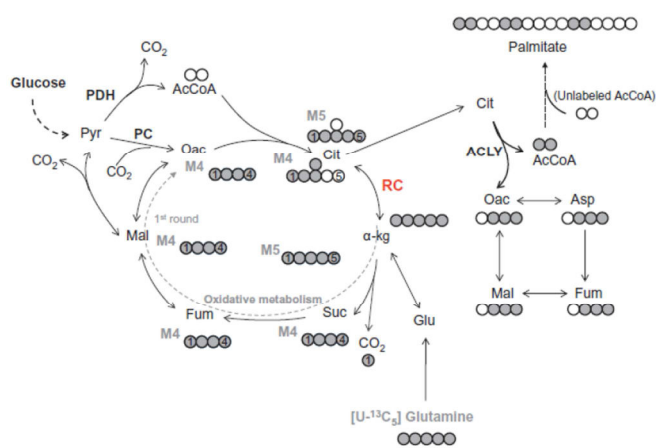


Figure 20 : Carte des composés marqués par la glutamine $^{13}\text{C}_5$ avec leur nombre de carbones marqués. [Zhang *et al.*, 2014]

Transitions pour la Glutamine $^{13}\text{C}_5$:

Composé	Transition du naturel	Transition du marqué
Glutamate	246>156	250>160
aKG	347>291	352>294
Succinate	172>112	176>116
Fumarate	245>217	249>220
Glutarate	158>115	161>117
Proline	186>142	190>146
Proline	142>91	145>94
2-HG	247>129	251>133
Citrate (Oxidative metabo)	465>273	470>278
Citrate (Reductive Carbox)	465>273	469>277

Annexe 13 : Tableaux d'analyse des effets de l'inhibiteur AG-221 sur les métabolites.

Nomstd	METHODE	Nom.officiel.retenu	p.ttest	t	ratio
	PFPP	Trp Arg Met	0.00035	8.591	3.133
C02630	HILIC	X2.Hydroxyglutaric	0.00066	7.516	2.265
C00864	HILIC	Panthtenic	0.00146	6.326	2.211
	GCMS	Cmpd ion 192	0.00146	6.324	1.391
C00864	HILIC	Pantothenic	0.00146	6.321	2.211
	PFPP	3-amino-octanoic acid	0.00236	-5.678	0.496
C00408	HILIC	Pipecolic.Isom2	0.00277	-5.477	0.619
C00314	HILIC	Pyridoxine	0.00330	-5.260	0.713
C00408	HILIC	Pipecolic.Isom1	0.00361	-5.150	0.622
C00487	HILIC	Carnitine	0.00367	-5.133	0.522
C02630	GCMS	X2-hydroxyglutaric	0.00549	4.668	1.652
	GCMS	Mevalonolactone	0.00580	4.608	1.220
C01677	PFPP	His Glu	0.00652	4.479	1.792
C00870	HILIC	X4.NITROPHENOL	0.00795	4.268	1.313
	GCMS	Cmpd ion 243	0.00835	4.217	1.631
C01341	PFPP	E-64	0.00958	4.076	2.970
C00475	PFPP	Cytidine	0.00980	-4.053	0.604
C01909	PFPP	Dethiobiotin	0.01059	3.975	1.429
	PFPP	2-Methylbutyroylcarnitine	0.01092	-3.944	0.461
C00180	HILIC	BENZOIC..4.HYDROXYBENZALDEHYDE	0.01130	3.910	1.306
C00035	HILIC	GDP	0.01146	3.896	1.674
C00300	HILIC	Creatine.1	0.01260	-3.802	0.692
	PFPP	1-L-Leucyl-L-Proline	0.01306	3.767	1.255
C16403	PFPP	4-Amino-2-hydroxylamino-6-nitrotoluene	0.01310	3.764	1.664
	HILIC	Valine_Betaine	0.01328	-3.751	0.818
C00300	HILIC	Creatine	0.01335	-3.746	0.705
C00245	HILIC	Taurine.1	0.01422	-3.685	0.703
C01042	HILIC	N.ACETYL.L.ASPARTIC	0.01443	-3.671	0.442
C00249	GCMS	Palmitic	0.01487	3.642	1.225
C20826	HILIC	X2.Methylbutyroylcarnitine.Isovalerylcarnitine	0.01532	-3.614	0.413
	HILIC	Hydroxypyridine	0.01536	3.611	1.704
	GCMS	Cmpd 16.853	0.01575	3.587	1.230
C14416	PFPP	3-Amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole	0.01677	3.528	1.277
C20826	HILIC	Isovalerylcarnitine	0.01721	-3.504	0.410
C00183	HILIC	Valine	0.01738	-3.495	0.823
C00245	HILIC	Taurine	0.01752	-3.487	0.613
C15439	PFPP	2-Methacryloyloxyethylphenylphosphate	0.01769	3.478	1.255
	GCMS	Cmpd Pyrido	0.01787	3.469	1.383
	PFPP	Demethylazelastine	0.01835	3.444	1.937
C00380	PFPP	Cytosine	0.01850	-3.437	0.650
C01530	GCMS	Stearic	0.01943	3.391	1.283
	GCMS	Cmpd 6.534	0.02073	3.332	1.439
C06469	PFPP	Neuraminicacid	0.02115	3.314	1.792
C01210	PFPP	N-Methylethanolaminephosphate	0.02183	-3.285	0.724
C04583	PFPP	6-Hydroxyl-1,6-dihydropurineribonucleoside	0.02248	3.259	1.483
	GCMS	Cmpd 38.894	0.02311	3.234	1.259
C00363	PFPP	dTDP	0.02342	3.222	1.266
C00392	PFPP	Mannitol	0.02636	3.116	1.554
C03366	PFPP	5-Phosphonooxy-L-lysine	0.02704	3.094	1.528
C00062	HILIC	DL.ARGININE	0.02720	3.089	1.225
C00077	HILIC	Ornithine	0.02949	-3.018	0.824
	GCMS	Ethylmalonic	0.03073	2.982	1.132

	GCMS	Cmpd 5.250	0.03073	2.982	1.339
C03995	PFPP	4-Nitrophenyl-3-ketovalidamine	0.03146	2.962	1.581
C08261	HILIC	AZELAIC	0.03291	2.923	1.590
C02571	HILIC	acetylcarnitine	0.03320	-2.915	0.465
C10355	PFPP	Fluorescein	0.03351	2.907	1.309
C00022	GCMS	Pyruvic	0.03357	2.906	1.501
C00294	HILIC	INOSINE	0.03365	-2.904	0.632
C02571	HILIC	Acetylcarnitine	0.03410	-2.892	0.464
C03017	PFPP	O-propanoyl-carnitine	0.03510	-2.868	0.574
	GCMS	Cmpd 11.057	0.03530	2.863	1.264
C00263	HILIC	Hypoxanthine	0.03578	-2.851	0.749
D00224	HILIC	Allopurinol	0.03631	-2.839	0.784
C13624	HILIC	X3.AMINO.3..4.HYDROXYPHENYL.PROPAN	0.03654	2.833	1.308
C00294	HILIC	Inosine	0.03700	-2.822	0.624
C03853	PFPP	Bis(glycerophospho)-glycerol	0.03758	2.809	1.552
C02494	PFPP	1-Methyladenosine	0.03795	2.801	1.159
	PFPP	Leucomethylene blue (Reduced Methylene Blue)	0.03823	2.795	1.460
	GCMS	Cmpd 8.667	0.03828	2.794	1.198
C00097	PFPP	L-Cysteine	0.03852	2.788	1.765
C00263	HILIC	L.HOMOSERINE	0.03988	2.759	1.317
C14216	PFPP	4,4-Sulfonyldiphenol	0.04144	-2.727	0.398
C13698	PFPP	Niflumicacid	0.04158	2.724	1.321
C02487	PFPP	Val Ser Pro	0.04372	2.682	1.558
C00140	PFPP	N-Acetyl-D-glucosamine	0.04595	2.641	2.013
C03955	PFPP	N6-Acetyl-N6-hydroxy-L-lysine	0.04763	-2.611	0.754
C00062	PFPP	Arginine	0.04943	2.580	1.266
C03017	HILIC	Propionylcarnitine_isomer1	0.04998	-2.571	0.517
	PFPP	Phe Asp	0.05024	2.567	1.343
C01673	PFPP	Calcitriol	0.05063	-2.560	0.507
C00864	GCMS	Pantothenic	0.05107	2.553	1.954
C01225	PFPP	sn-glycero-3-Phospho-1-inositol	0.05239	-2.532	0.817
C03017	HILIC	Propanoyl_carnitine	0.05278	-2.526	0.519
C04109	PFPP	Myricetin	0.05344	2.516	1.475
C13058	PFPP	CalciumL-aspartate	0.05357	2.514	1.812
C00250	PFPP	Pyridoxal	0.05494	2.493	1.448
C08338	PFPP	Proacacipetalin	0.05547	2.485	1.852
	HILIC	ADP..dGDP	0.05555	2.484	1.807
C00077	HILIC	Ornithine.1	0.05584	2.480	1.153
C01924	PFPP	Homoarginine	0.05630	2.473	1.076
C00262	HILIC	Hypoxanthine_1	0.05751	-2.456	0.834
C11102	PFPP	HymexazolO-glucoside	0.05896	2.436	1.300
C00188	PFPP	L-Threonine	0.05926	2.432	1.547
C00123	GCMS	Leucine	0.05933	2.431	1.462
C10722	PFPP	Melicopicine	0.05998	2.422	1.789
C01746	PFPP	Piperidine	0.06062	-2.413	0.929
C00042	HILIC	succinic	0.06118	-2.406	0.774
C01879	HILIC	oxoproline	0.06135	2.404	1.358
C00270	PFPP	N-Acetylneuraminic Acid	0.06139	2.403	2.849
C01092	PFPP	8-Amino-7-oxononanoate	0.06142	2.403	2.114
C11019	PFPP	Pendimethalin	0.06219	2.393	2.139
C01233	PFPP	Glycerolphosphorylethanolamine	0.06339	2.377	1.423
C02413	PFPP	Heptopyranosides	0.06436	-2.365	0.483
C00124	HILIC	D.galactose	0.06496	2.357	1.763
C00392	HILIC	D.MANNITOL	0.06653	2.338	1.202
C08429	PFPP	Clitidine5-phosphate	0.06736	2.328	1.337

	GCMS	Cmpd 5.775	0.06776	2.323	1.220
	HILIC	N.acetyl.cytidine	0.06851	-2.315	0.589
	PFPP	5-Methylcytidine	0.07013	2.296	1.854
C00794	HILIC	Sorbitol	0.07366	2.257	1.198
C07086	HILIC	phenylacetic	0.07398	2.253	1.279
C00257	HILIC	GLUCONIC	0.07420	-2.251	0.828
C00183	HILIC	Valine.1	0.07438	2.249	1.215
C00719	HILIC	BETAINE	0.07472	2.245	1.216
C09387	PFPP	15-octadecene-9,11,13-triynoic acid	0.07592	2.233	124.318
C00042	HILIC	succinate	0.07975	-2.193	0.789
C00093	PFPP	beta-Glycerophosphoric acid	0.08268	-2.165	0.541
	GCMS	Cmpd 22.211	0.08487	2.144	1.180
C11352	PFPP	5,6-Dichloro-1,3-cyclohexadiene	0.08595	2.134	1.923
C00065	GCMS	Serine	0.08625	2.131	1.842
C10658	PFPP	Magnoshinin	0.08643	2.130	1.686
C00299	HILIC	Uridine	0.08727	-2.122	0.724
C06424	GCMS	Tetradecanoic	0.08744	2.121	1.158
C03519	HILIC	N.Acetyl.L.phenylalanine.Phenylpropionylglyci	0.09034	2.095	1.248
C00475	HILIC	CYTIDINE..ISOLEUCINE	0.09146	-2.085	0.744
C04540	PFPP	Met Trp	0.09204	2.080	2.179
C10313	PFPP	Chryso-obtusinglucoside	0.09610	2.046	1.738
C00065	HILIC	Serine	0.09644	2.043	1.246
C00791	HILIC	Creatinine.1	0.09970	-2.017	0.894
C05939	PFPP	Linatine	0.10260	-1.995	0.640
C00188	GCMS	Threonine	0.10375	1.986	1.495
C11158	PFPP	Topotecan	0.10470	1.979	3.375
C00041	HILIC	alanine	0.10662	-1.965	0.863
C00099	HILIC	b.ALANINE	0.10727	-1.960	0.859
C00082	GCMS	Tyrosine	0.10739	1.959	2.284
C00079	GCMS	Phenylalanine	0.10811	1.954	2.000
C03312	PFPP	UrateD-ribonucleotide	0.11186	1.927	1.315
C00791	HILIC	Creatinine	0.11277	-1.921	0.901
	PFPP	N-Acetylcadaverine	0.11382	1.914	1.318
	HILIC	Gly.Val	0.11517	-1.905	0.823
C00258	GCMS	Glyceric	0.11706	-1.892	0.775
C00978	PFPP	N-Acetylserotonin	0.11712	-1.892	0.502
	HILIC	Acetylarginine	0.11933	1.877	1.125
C00079	HILIC	Phenylalanine.2	0.11952	1.876	1.129
	PFPP	Norophthalmic acid	0.12086	1.867	1.171
C00612	HILIC	acetylspermidine	0.12206	-1.859	0.731
C00047	HILIC	lysine	0.12235	1.858	1.124
C00570	PFPP	CDP-ethanolamine	0.12323	1.852	1.546
C00158	HILIC	citric	0.12440	1.845	1.381
C05345	HILIC	Glucose_Fructose6P	0.12560	-1.837	0.710
C00082	HILIC	L.Threo.3.Phenylserine..Tyrosine	0.12832	1.821	1.249
C00082	HILIC	Tyrosine	0.12843	1.820	1.239
C06034	PFPP	4-Hydroxy-4-methylglutamate	0.12962	1.813	2.014
C01175	PFPP	1-O-Sinapoyl-beta-D-glucose	0.13130	1.803	1.994
C00137	GCMS	Myoinositol	0.13214	1.798	1.822
	PFPP	2-Hydroxy-3-(4-methoxyethylphenoxy)-propanoic acid	0.13291	1.793	1.427
C08995	PFPP	AurasperoneD	0.13316	1.792	2.082
C16199	HILIC	X5.SULFOSALICYLIC	0.13326	1.791	1.909
C16199	HILIC	X5.sulfosalicylic	0.13356	1.789	1.908
C00387	PFPP	8-Hydroxy-deoxyguanosine	0.13600	-1.775	0.674
C00160	GCMS	Glycolic	0.13758	1.766	1.275

C00188	HILIC	Threonine_ L.Allo.threonine	0.14066	1.749	1.187
C00311	HILIC	ISOCITRIC	0.14074	1.749	1.320
	PFPP	Phe Glu Trp	0.14321	1.735	2.028
C05636	PFPP	3-Hydroxykynurenamine	0.14438	1.729	5.982
C10394	PFPP	Pseudopurpurin	0.14689	1.716	2.899
C05345	HILIC	D.Fructose_6P..D.Glucose_6_p	0.14766	-1.712	0.728
C09784	PFPP	10-Hydroxyloganin	0.15032	1.698	1.783
C00029	HILIC	UDP.Glucose..UDPGalactose	0.15093	1.695	1.515
C00062	HILIC	Arginine	0.15241	1.687	1.162
C04336	PFPP	N-Glycolyl-D-mannosamine6-phosphate	0.15384	1.680	1.262
C15422	PFPP	2alpha-Methyl-17beta-[(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]-5alpha-	0.15526	1.673	21.775
C00152	PFPP	Asparagine	0.15739	1.662	1.505
C00041	GCMS	Alanine	0.15881	1.655	1.265
C11305	PFPP	Triphenyltetrazoliumchloride	0.16219	1.639	1.162
	GCMS	Cmpd 11.377	0.16336	1.633	1.158
C20827	GCMS	X3-hydroxyisovaleric	0.16743	1.614	1.187
C09755	PFPP	Hesperidin	0.16812	1.611	2.482
C05598	HILIC	Methylhippuric.Phenylacetylglycine_1	0.16948	-1.605	0.895
C02946	HILIC	acetamidobutanoate_1	0.17059	1.600	1.132
C13179	PFPP	Fleroxacin	0.17487	-1.580	0.714
C00847	HILIC	X4.PYRIDOXIC	0.17496	-1.580	0.849
C11172	PFPP	Simazine	0.17501	-1.580	0.978
C15048	PFPP	7-(Acetyloxy)-3-(3-pyridinyl)-2H-1-benzopyran-2-one	0.17581	1.576	1.616
C00922	PFPP	adipate	0.17583	1.576	1.063
C10196	PFPP	Scolymoside	0.17697	-1.571	0.937
C02811	PFPP	Anhydrotetracycline	0.17867	-1.564	0.886
C00170	PFPP	5-Methylthioadenosine	0.18173	1.550	1.783
	PFPP	Chlordiazepoxide	0.18180	1.550	24.371
C02728	PFPP	Ne-Methyl-L-lysine	0.18204	1.549	1.260
C00078	HILIC	DL.TRYPTOPHAN	0.18230	1.548	1.093
C00031	GCMS	Glucose	0.18377	-1.542	0.719
C00188	HILIC	L.threonine	0.18449	1.539	1.191
C00624	HILIC	N.ACETYL.DL.GLUTAMIC	0.18464	1.538	1.110
C11992	PFPP	L-Oleandrosyl-oleandolide	0.18621	1.531	2.140
C04020	PFPP	Meprobamate	0.18738	1.527	32.644
C10559	PFPP	Diphyllin	0.18781	1.525	1.090
C00073	GCMS	Methionine	0.18985	1.516	1.590
C00212	HILIC	ADENOSINE	0.19221	1.507	1.795
C02486	HILIC	DL.β.LEUCINE	0.19464	1.497	1.113
C04721	PFPP	N-(3alpha,12alpha-dihydroxy-5beta-cholan-24-oyl)-glycine	0.19711	1.487	1.044
C11075	PFPP	N-Carboxytocainide	0.20005	1.476	1.111
C00147	HILIC	Adenine	0.20127	1.471	1.742
C00354	PFPP	D-Fructose1,6-bisphosphate	0.20973	-1.439	0.635
C03797	PFPP	OxidizedPhotinusluciferin	0.20977	-1.439	0.819
C03411	PFPP	N-Glycosyl-L-asparagine	0.20986	1.438	1.098
C09020	PFPP	bromovulone I	0.21394	-1.423	0.672
C00474	HILIC	ADONITOL_M.Cl	0.21474	-1.420	0.915
C14663	PFPP	Testosterone isocaproate	0.21566	1.417	7.850
C13280	PFPP	Nicorandil	0.21621	-1.415	0.872
C00954	HILIC	Indoleacetic.bis	0.22200	1.394	1.407
C11766	PFPP	Rivastigmine	0.22238	1.393	3.805
C00258	HILIC	D.GLYCERIC	0.22485	-1.384	0.856
C11045	PFPP	Glutamylphenylalanine	0.22534	1.383	1.742
C00209	HILIC	Oxalic	0.22864	1.371	1.578

	PFPP	Val Val	0.23066	-1.364	0.820
C00670	HILIC	Glycerophosphocholine	0.23071	1.364	1.334
C00064	HILIC	Glutamine	0.23205	1.360	1.162
C02376	HILIC	Methylcytosine_isomer	0.23444	-1.352	0.868
C00290	PFPP	Fibrin	0.23485	-1.350	0.817
C03793	HILIC	Trimethyllysine	0.23569	1.347	1.145
C06371	PFPP	Lacto-N-tetraose	0.23766	1.341	1.688
C07493	PFPP	Dyphylline	0.23910	-1.336	0.950
C02376	HILIC	X5.Methylcytosine	0.24145	-1.328	0.866
C02918	HILIC	Methylnicotinamide	0.24212	1.326	1.727
C01990	PFPP	3-Oxalomalate	0.24383	-1.321	0.728
C10227	PFPP	Galocatechin-(4alpha->8)-epigallocatechin	0.24442	1.319	1.676
C00611	PFPP	Lacto-N-biose I	0.24637	1.312	6.830
	PFPP	N-alpha-Acetyl-L-arginine	0.24646	1.312	1.300
C02700	PFPP	L-Formylkynurenine	0.24838	-1.306	0.843
	PFPP	Leu Asp	0.24851	1.306	11.471
C00153	PFPP	Nicotinamide	0.24855	-1.306	0.859
C01879	GCMS	Pyroglutamic	0.24860	-1.305	0.910
C04299	PFPP	Inositol cyclic phosphate	0.24861	-1.305	0.760
C00581	HILIC	Guanidoacetic	0.24973	1.302	1.126
C00152	HILIC	Asparagine	0.25353	1.290	1.130
C10556	PFPP	Deoxypodophyllotoxin	0.25524	1.285	1.755
	GCMS	Cmpd 28.081	0.25916	1.273	1.791
C00122	HILIC	fumaric	0.25976	1.271	1.125
C00167	HILIC	UDP.glucuronic	0.26281	-1.261	0.747
C11113	PFPP	Methaphenilene	0.26704	1.249	1.115
C01561	PFPP	Calcidiol	0.26828	1.245	1.829
C07499	PFPP	Phenylethylmalonamide	0.26871	1.244	1.069
C00245	PFPP	Taurine	0.27336	-1.230	0.796
C15331	PFPP	17beta-Hydroxy-6beta-methyl-5alpha-androstan-3-onepropionate	0.27748	-1.218	0.170
C00624	HILIC	N.ACETYL.L.GLUTAMIC	0.27782	1.217	1.097
C00221	GCMS	Cmpd beta D glucopyranose	0.28129	1.207	1.581
C10826	PFPP	Tomatidine	0.28229	1.205	3.971
C00407	GCMS	Isoleucine	0.28576	1.195	1.184
C00153	HILIC	Nicotinamide.1	0.29193	-1.178	0.897
C01004	HILIC	Trigonelline	0.29376	1.173	1.730
C00259	HILIC	arabinose	0.29895	1.159	1.169
C00216	HILIC	D.....ARABINOSE	0.30104	1.153	1.168
C00153	HILIC	Nicotinamide	0.30222	-1.150	0.899
C09332	PFPP	Tetrahydrofolyl-[Glu](2)	0.30225	-1.150	0.954
C01004	HILIC	Trigonelline.1	0.30343	1.147	1.697
C00135	HILIC	Histidine	0.30480	1.143	1.108
C06870	PFPP	7-Hydroxytrifluoperazine	0.30501	-1.142	0.737
C00158	GCMS	Citric	0.30728	1.136	1.281
C06658	PFPP	Ser Pro	0.31438	1.118	1.160
C00186	GCMS	Lactic	0.31508	1.116	1.041
C08883	PFPP	Uscharidin	0.32222	1.098	1.333
C00188	HILIC	Threonine	0.32451	1.092	1.157
C01005	PFPP	O-Phospho-L-serine	0.32549	1.090	1.743
C11698	PFPP	UH-301	0.32896	1.081	1.600
C02862	HILIC	Butyryl_carnitine	0.33780	-1.060	0.863
C00385	HILIC	Xanthine	0.33879	-1.057	0.934
C11821	PFPP	5-Hydroxyisourate	0.34078	-1.052	0.807
C01013	GCMS	X3-hydroxypropionic	0.34142	1.051	1.082
C00314	HILIC	pyridoxine	0.34170	-1.050	0.922

C10523	PFPP	Psoralidin	0.34608	1.040	1.791
C00503	GCMS	Erythritol	0.36280	1.001	1.093
C00026	GCMS	X2-ketoglutaric	0.37769	-0.968	0.681
C04428	PFPP	Epirubicinol	0.38309	0.956	1.604
C02350	HILIC	ALLANTOIN	0.38329	-0.955	0.893
C13558	PFPP	Dibasicsodiumphosphate	0.38346	-0.955	0.763
C02155	PFPP	Glycyl-L-leucine	0.38871	-0.944	0.934
	HILIC	UK51	0.39447	0.931	1.072
C01512	PFPP	Ethynylestradiol 3-sulfate	0.39830	-0.923	0.904
C00148	GCMS	Proline	0.39894	-0.922	0.913
C00345	PFPP	6-Phospho-D-gluconate	0.39930	0.921	1.350
C01035	HILIC	Guanidinobutanoic	0.39972	0.920	1.091
C02862	HILIC	Butyrylcarnitine	0.40019	-0.919	0.876
	GCMS	Cmpd 10.350	0.40099	0.917	1.084
C00009	GCMS	Cmpd 24.288	0.40238	-0.915	0.825
C07967	PFPP	Bithionol	0.40301	0.913	1.118
C02714	PFPP	N-Acetylputrescine	0.40497	0.909	1.110
C00111	PFPP	Glyceronephosphate	0.41403	-0.890	0.755
C01657	PFPP	Ac-Tyr-OEt	0.41734	0.884	1.303
C05118	PFPP	S-(2-Methylbutanoyl)-dihydrolipoamide	0.42100	-0.876	0.420
C15207	PFPP	17beta-Estradiol-3-(beta-D-glucuronide)17-sulfate	0.42147	-0.875	0.934
C00106	GCMS	Uracil	0.43421	0.850	1.070
C00137	GCMS	Cmpd 36.555	0.43557	0.847	1.251
C00791	PFPP	Creatinine	0.43800	0.842	1.090
C00049	HILIC	Aspartic	0.43998	0.839	1.082
C00037	GCMS	Glycine	0.44083	0.837	1.123
C00078	HILIC	Tryptophan.1	0.44330	0.832	1.071
C01404	PFPP	Dimethyl-L-arginine	0.45090	0.817	1.106
C00064	GCMS	Glutamine	0.45492	0.810	1.239
C01833	PFPP	Val Pro Ala	0.45591	-0.808	0.918
C00078	HILIC	Tryptophan	0.45673	0.806	1.067
	GCMS	Cmpd 9.839	0.46001	0.800	1.203
C02714	HILIC	N.acetylputrescine	0.46363	0.793	1.074
C12986	PFPP	N2-Acetyl-L-aminoadipate	0.47192	-0.778	0.886
C02237	HILIC	D.PYROGLUTAMIC	0.47432	-0.773	0.932
C00123	HILIC	Leucine	0.48128	0.760	1.061
C05828	HILIC	Methylimidazoleacetic	0.48240	-0.758	0.869
C11224	PFPP	Isonicotinamide, 2-propyl-	0.48459	0.754	3.771
C00047	HILIC	Lysine	0.49355	0.738	1.075
C06559	PFPP	Deethylatrazine	0.49864	0.729	1.041
	GCMS	Cmpd 6.468	0.49871	0.729	1.103
	HILIC	Mevalonolactone	0.50364	0.720	1.158
C03761	HILIC	X3.HYDROXY.3.METHYLGLU_M.H.C2H4O2	0.50640	-0.715	0.946
C01585	HILIC	CAPROIC_	0.51561	0.699	1.074
C00666	HILIC	Diaminopimelic	0.51716	0.697	1.066
C10066	PFPP	Gentisin	0.51894	0.693	1.423
C00149	GCMS	Malic	0.52044	0.691	1.104
C00217	HILIC	D.glutamic	0.52057	-0.691	0.943
C04421	PFPP	N-Succinyl-L-2,6-diaminoheptanedioate	0.52311	-0.686	0.706
C08342	PFPP	Triglochinin	0.53752	0.662	1.331
C00122	GCMS	Fumaric	0.54270	0.653	1.078
C00022	HILIC	Pyruvate	0.54273	-0.653	0.902
	HILIC	Pro.Gly	0.55173	0.638	1.109
C13733	PFPP	(S)-ATPA	0.55299	-0.636	0.891
C06323	PFPP	Isoquinoline	0.56019	0.624	1.248

C03224	PFPP	3,5-Dibromo-L-tyrosine	0.56573	0.615	4.783
C00186	HILIC	lactate	0.56641	0.613	1.041
C00031	GCMS	Cmpd Glucopyranose	0.56870	-0.610	0.807
C01375PKNRP	PFPP	Tacrolimus	0.57635	-0.597	0.395
C00437	PFPP	N-Acetylnornithine	0.57954	-0.592	0.930
C00872	GCMS	Aminomalonic	0.58663	-0.581	0.905
C04137	PFPP	N2-(D-1-Carboxyethyl)-L-arginine	0.59217	0.572	1.402
C00049	GCMS	Aspartic	0.59476	0.568	1.102
	GCMS	Cmpd 25.803	0.60340	0.554	1.113
C11571	PFPP	2-p-Tolyl-5,6,7,8-tetrahydrobenzo[d]imidazo[2,1-b]thiazole	0.61077	0.542	1.128
	PFPP	Desmosine	0.61792	0.531	1.152
C01133	PFPP	N-Acetyl-D-glucosamine	0.62732	0.517	2.244
C00074	HILIC	PEP	0.64008	0.497	1.065
C11097	PFPP	F5231	0.64033	0.497	1.158
	PFPP	L-Acetylcarnitine	0.64038	-0.497	0.960
C04203	PFPP	N,N-Dimethyl-1,4-phenylenediamine	0.64054	0.497	1.158
C00286	HILIC	ATP2..dGTP	0.64069	0.496	1.175
C04521	PFPP	2,7-Anhydro-alpha-N-acetylneuraminicacid	0.64650	-0.488	0.806
C00780	PFPP	Cotinine	0.64660	-0.487	0.955
	HILIC	Glycyl.Proline	0.64929	0.483	1.084
C00135	HILIC	L.HISTIDINE	0.65044	0.482	1.051
C01152	HILIC	Methylhistidine	0.65153	-0.480	0.934
C07574	PFPP	Tartrazine	0.65160	0.480	1.076
D00496	HILIC	D.PENICILLAMINE	0.65961	0.468	1.055
C00117	PFPP	D-Ribose 5-phosphate	0.67376	-0.447	0.964
C14686	PFPP	Dicyclohexylamine	0.68569	0.429	1.115
C10880	PFPP	Savinin	0.68921	0.424	1.149
C05678	PFPP	O-Phosphoethanolamine	0.69649	0.413	1.098
C04000	PFPP	Benzyl2-methyl-3-oxobutanoate	0.69652	-0.413	0.974
C00366	HILIC	Uric	0.69939	0.409	1.061
C01239	PFPP	Morantel	0.69961	0.409	1.084
C01152	PFPP	N(pi)-Methyl-L-histidine	0.70138	-0.406	0.957
C12987	PFPP	N2-Acetyl-L-aminoadipyl-delta-phosphate	0.70358	0.403	1.078
C00281	PFPP	D-Sedoheptulose 7-phosphate	0.72177	0.377	1.093
	PFPP	Biotripyrrin-b	0.72605	-0.371	0.988
C00140	HILIC	N.ACETYL.D.GLUCOSAMINE	0.73556	0.357	1.051
C03592	PFPP	5-Methyldeoxycytidine	0.73597	-0.357	0.840
C00079	HILIC	Phenylalanine	0.73854	0.353	1.028
C00079	HILIC	Phenylalanine.isomer	0.73854	0.353	1.028
	GCMS	Cmpd 17.092	0.73964	-0.351	0.938
C00872	GCMS	Aminomalonic2	0.74236	-0.348	0.936
C00314	PFPP	5-Hydroxydopamine	0.75472	-0.330	0.982
C03761	HILIC	X3.HYDROXY.3.METHYLGLUTARIC	0.76382	-0.317	0.954
C00785	PFPP	Urocanate	0.77044	0.308	1.185
C01586	HILIC	HIPPURIC	0.77069	-0.308	0.969
C19569	HILIC	X3.SUCCINOYLPYRIDINE	0.77254	-0.305	0.970
C01924	HILIC	Homoarginine	0.77313	0.304	1.041
C00791	HILIC	creatinine	0.77958	-0.295	0.972
C00077	GCMS	Ornithine	0.79199	-0.278	0.945
C07225	PFPP	Minocycline	0.79267	0.277	1.125
	GCMS	Phosphate	0.79365	-0.276	0.969
C01251	PFPP	2-Methylcitric acid	0.79407	0.275	1.087
	GCMS	Cmpd 22.616	0.79807	0.270	1.054
C00236	HILIC	3.PHOSPHOGLYCERIC	0.80969	-0.254	0.972
C00079	HILIC	Phenylalanine.1	0.81128	0.252	1.017

	PFPP	Leu Ala	0.82118	-0.238	0.953
C00149	HILIC	malic	0.82294	0.236	1.030
C00042	GCMS	Succinic	0.82704	0.230	1.023
	HILIC	X2.AMINONICOTINIC...3.HYDROXYPICOLINAMIDE	0.83288	0.222	1.094
C00041	HILIC	Alanine	0.84836	-0.201	0.980
	GCMS	Cmpd 25.727	0.85617	-0.191	0.972
C00073	HILIC	Methionine	0.85931	0.187	1.024
C07751	PFPP	Dofetilide	0.86083	0.185	1.078
C02712	HILIC	N.Acetyl.D.penicillamine..N.ACETYL.L.METHIONINE	0.86661	-0.177	0.969
C00785	HILIC	Urocanate	0.87458	0.166	1.082
C12106	PFPP	AminoDAHP	0.87504	-0.165	0.979
C00078	PFPP	L-Tryptophan	0.87764	-0.162	0.994
C00120	PFPP	D-Biotin	0.89595	0.138	1.013
C07246	PFPP	Sertraline	0.90118	0.131	1.009
C00429	HILIC	Hydrouracil	0.90347	0.128	1.011
C00423	PFPP	trans-Cinnamate	0.91609	-0.111	0.992
C00073	HILIC	METHIONINE	0.91774	0.109	1.014
C00025	HILIC	Glutamic	0.91925	-0.107	0.986
C02494	HILIC	METHYLADENOSINE	0.92164	0.103	1.009
C07090	PFPP	Protoanemonin	0.92380	0.101	1.029
C00327	HILIC	Citrulline	0.93333	-0.088	0.985
C00074	HILIC	phosphoenolpyruvic	0.94177	-0.077	0.989
C06455	PFPP	Hydroxymethylphosphonate	0.94621	0.071	1.023
C06656	PFPP	Deoxyguanidinoproclavaminicacid	0.94682	-0.070	0.971
C00906	HILIC	Dihydrothymine	0.97594	-0.032	0.997
C14183	PFPP	Compactindiollactone	0.98808	0.016	1.004
C12768	PFPP	Timepidiumbromide	0.99915	0.001	1.000

Nomstd	Nom.official.retenue	METHODE	p	stat	p.D2	stat.D2	ratio.D2
C02630	X2.Hydroxyglutaric	HILIC	0.000034	-6.169	0.003	-8.690	0.388
C05678	O-Phosphoethanolamine	PFPP	0.001303	-4.079	0.296	-1.261	0.795
C00158	citric	HILIC	0.003421	3.570	0.019	4.589	3.257
C00311	ISOCITRIC	HILIC	0.005391	3.333	0.018	4.709	2.924
C02494	Methyladenosine	PFPP	0.012394	2.901	0.148	1.941	1.558
C02494	METHYLADENOSINE	HILIC	0.017958	2.707	0.187	1.702	1.498
C02630	X2-hydroxyglutaric	GCMS	0.028638	-2.461	0.117	-2.185	0.476
C07574	Tartrazine	PFPP	0.050767	-2.152	0.035	-3.676	0.675
C00570	CDP-ethanolamine	PFPP	0.064145	-2.023	0.045	-3.321	0.801
C00354	D-Fructose1,6-bisphosphate	PFPP	0.100783	1.766	0.246	1.437	1.246
C07086	phenylacetic	HILIC	0.120218	-1.663	0.139	-2.006	0.901
C00158	Citric	GCMS	0.133055	1.602	0.816	0.254	1.105
C00363	dTDP	PFPP	0.136222	-1.588	0.696	-0.431	0.957
C00022	Pyruvic	GCMS	0.144863	-1.551	0.630	0.534	1.142
C00345	6-Phospho-D-gluconate	PFPP	0.147449	1.540	0.662	-0.483	0.906
C07967	Bithionol	PFPP	0.168968	-1.457	0.041	-3.436	0.805
C01233	Glycerolphosphorylethanolamine	PFPP	0.172065	-1.445	0.168	-1.809	0.707
C01341	E-64	PFPP	0.175969	-1.431	0.231	-1.499	0.529
C04109	Myricetin	PFPP	0.189075	-1.386	0.431	0.908	1.119

C01833	Val Pro Ala	PFPP	0.190593	-1.381	0.048	-3.233	0.709
C11019	Pendimethalin	PFPP	0.194430	-1.368	0.088	-2.492	0.680
	3-amino-octanoic acid	PFPP	0.214156	-1.306	0.060	-2.951	0.696
	Cmpd 22.616	GCMS	0.222277	-1.282	0.346	-1.115	0.705
C03519	N.Acetyl.L.phenylalanine.Phenylpropio nylglyci	HILIC	0.227345	-1.267	0.811	-0.261	0.969
	Hydroxypyridine	HILIC	0.240498	-1.230	0.627	-0.539	0.758
C00124	D.galactose	HILIC	0.243009	-1.223	0.066	-2.827	0.868
	5-Methylcytidine	PFPP	0.248567	-1.208	0.123	-2.129	0.813
C08338	Proacacipetalin	PFPP	0.250748	-1.202	0.143	-1.976	0.783
C04299	Inositol cyclic phosphate	PFPP	0.257219	1.185	0.765	-0.327	0.975
C02712	N.Acetyl.D.penicillamine..N.ACETYL.L. METHIONINE	HILIC	0.257335	-1.185	0.243	-1.448	0.866
C14686	Dicyclohexylamine	PFPP	0.274445	1.141	0.635	0.526	1.304
C03312	UrateD-ribonucleotide	PFPP	0.303163	-1.072	0.944	-0.076	0.995
C00209	Oxalic	HILIC	0.306624	-1.064	0.243	-1.450	0.876
C03366	5-Phosphonooxy-L-lysine	PFPP	0.311152	-1.054	0.413	-0.948	0.878
	Leu Asp	PFPP	0.318765	-1.037	0.031	-3.830	0.823
C10394	Pseudopurpurin	PFPP	0.322060	-1.029	0.938	-0.084	0.983
	Mevalonolactone	HILIC	0.322485	-1.028	0.924	-0.104	0.974
C00212	ADENOSINE	HILIC	0.323488	-1.026	0.247	1.434	1.118
C00122	fumaric	HILIC	0.330284	-1.011	0.042	-3.422	0.842
C00872	Aminomalonic2	GCMS	0.346264	0.977	0.138	2.012	1.376
C07225	Minocycline	PFPP	0.354142	-0.961	0.362	-1.072	0.034
C00025	Glutamic	HILIC	0.355136	-0.959	0.931	-0.094	0.990
C01375PKN RP	Tacrolimus	PFPP	0.356676	0.956	0.231	1.497	174.984
C00147	Adenine	HILIC	0.360135	-0.949	0.352	1.100	1.167
C06371	Lacto-N-tetraose	PFPP	0.379735	-0.909	0.073	-2.720	0.784
C06034	4-Hydroxy-4-methylglutamate	PFPP	0.392344	-0.885	0.452	-0.862	0.813
C00140	N-Acetyl-D-glucosamine	PFPP	0.395353	-0.879	0.265	-1.366	0.786
C02155	Glycyl-L-leucine	PFPP	0.396990	-0.876	0.191	-1.685	0.783
C04540	Met Trp	PFPP	0.399776	-0.871	0.298	-1.256	0.739
C00294	Inosine	HILIC	0.402497	-0.865	0.231	-1.497	0.938
C00167	UDP.glucuronic	HILIC	0.403207	-0.864	0.150	-1.921	0.812
C04521	2,7-Anhydro-alpha-N- acetylneuraminicacid	PFPP	0.407298	-0.856	0.470	-0.825	0.045
C00978	N-Acetylserotonin	PFPP	0.408157	-0.855	0.329	-1.164	0.031
C00263	Hypoxanthine	HILIC	0.411059	-0.849	0.295	-1.265	0.913
C00149	malic	HILIC	0.415328	-0.841	0.216	-1.565	0.882
C05345	Glucose_Fructose6P	HILIC	0.420402	0.832	0.884	-0.158	0.977
C00217	D.glutamic	HILIC	0.423363	-0.827	0.606	-0.574	0.951
D00224	Allopurinol	HILIC	0.429497	-0.815	0.383	-1.020	0.909
	Cmpd 16.853	GCMS	0.434849	-0.806	0.996	0.005	1.000
C00122	Fumaric	GCMS	0.438479	-0.799	0.786	0.297	1.050
C03017	O-propanoyl-carnitine	PFPP	0.440036	-0.797	0.187	-1.706	0.778

C00082	Tyrosine	HILIC	0.440539	-0.796	0.851	0.204	1.027
C00270	N-Acetylneuraminic Acid	PFPP	0.441031	-0.795	0.070	-2.771	0.781
C11352	5,6-Dichloro-1,3-cyclohexadiene	PFPP	0.444384	-0.789	0.123	-2.126	0.806
	Leucomethylene blue (Reduced Methylene Blue)	PFPP	0.445611	0.787	0.996	0.005	1.000
C00082	L.Threo.3.Phenylserine..Tyrosine	HILIC	0.448038	-0.782	0.851	0.204	1.027
C03995	4-Nitrophenyl-3-ketoalidamine	PFPP	0.451336	-0.777	0.168	-1.809	0.715
C14216	4,4-Sulfonyldiphenol	PFPP	0.452652	-0.774	0.441	-0.886	0.034
C02862	Butyrylcarnitine	HILIC	0.453455	-0.773	0.580	-0.618	0.904
C00064	Glutamine	HILIC	0.457734	-0.765	0.789	-0.292	0.968
C00049	Aspartic	GCMS	0.459955	0.761	0.461	0.843	1.064
C00245	Taurine	PFPP	0.461187	-0.759	0.146	-1.954	0.750
C13558	Dibasicsodiumphosphate	PFPP	0.462279	-0.757	0.692	-0.437	0.947
C00245	Taurine.1	HILIC	0.468455	-0.747	0.130	-2.069	0.819
C13698	Niflumicacid	PFPP	0.474906	-0.736	0.117	-2.179	0.901
	Cmpd 8.667	GCMS	0.475988	-0.734	0.631	0.533	1.040
	Cmpd 5.250	GCMS	0.478439	-0.730	0.484	-0.797	0.906
	Norophthalmic acid	PFPP	0.483888	-0.721	0.294	-1.270	0.898
C05345	D.Fructose_6P..D.Glucose_6_p	HILIC	0.492746	0.706	0.648	-0.505	0.949
	Phe Asp	PFPP	0.494114	-0.704	0.355	-1.092	0.845
C00872	Aminomalonic	GCMS	0.496574	0.699	0.311	1.215	1.433
C00065	Serine	HILIC	0.497580	-0.698	0.639	-0.520	0.946
C02376	X5.Methylcytosine	HILIC	0.500145	-0.694	0.591	0.599	1.106
C13058	CalciumL-aspartate	PFPP	0.500294	-0.693	0.084	-2.550	0.703
C02376	Methylcytosine_isomer	HILIC	0.506660	-0.683	0.660	0.487	1.086
C01990	3-Oxalomalate	PFPP	0.513426	-0.672	0.930	0.095	1.018
C13733	(S)-ATPA	PFPP	0.515983	0.668	0.411	0.953	1.236
C01042	N.ACETYL.L.ASPARTIC	HILIC	0.517212	-0.666	0.035	-3.673	0.752
C01530	Stearic	GCMS	0.520105	-0.661	0.836	-0.226	0.987
C00140	N.ACETYL.D.GLUCOSAMINE	HILIC	0.521143	-0.659	0.064	-2.871	0.825
C11113	Methaphenilene	PFPP	0.521341	-0.659	0.536	-0.696	0.920
C09387	15-octadecene-9,11,13-triynoic acid	PFPP	0.524870	-0.653	1.000	1.000	1.000
C01092	8-Amino-7-oxononanoate	PFPP	0.529561	-0.646	0.176	-1.766	0.778
C00106	Uracil	GCMS	0.531570	-0.643	0.407	-0.962	0.851
C00624	N.ACETYL.DL.GLUTAMIC	HILIC	0.541612	-0.627	0.083	-2.557	0.798
C07090	Protoanemonin	PFPP	0.543428	0.624	0.045	-3.335	0.764
C00073	Methionine	HILIC	0.543697	-0.624	0.459	0.848	1.083
	Cmpd 11.377	GCMS	0.544726	-0.622	0.992	-0.011	0.998
	Trp Arg Met	PFPP	0.547429	-0.618	0.272	-1.343	0.829
C00870	X4.NITROPHENOL	HILIC	0.550233	0.613	0.964	0.049	1.013
C00152	Asparagine	HILIC	0.555435	-0.605	0.960	-0.054	0.993
C08261	AZELAIC	HILIC	0.556267	-0.604	0.002	-9.516	0.554
C00670	Glycerophosphocholine	HILIC	0.559378	-0.599	0.531	-0.707	0.889
C10722	Melicopicine	PFPP	0.560126	-0.598	0.118	-2.176	0.325
C00236	3.PHOSPHOGLYCERIC	HILIC	0.561816	-0.595	0.695	-0.432	0.957

C02413	Heptopyranosides	PFPP	0.563882	-0.592	0.880	-0.164	0.937
C00221	Cmpd beta D glucopyranose	GCMS	0.568725	0.585	0.135	2.035	1.265
C10066	Gentisin	PFPP	0.574602	-0.576	0.318	-1.195	0.727
C00954	Indoleacetic.bis	HILIC	0.580713	-0.566	0.990	0.014	1.007
C14183	Compactindiollactone	PFPP	0.581080	0.566	0.232	1.492	1.279
C00117	D-Ribose 5-phosphate	PFPP	0.581435	0.565	0.339	1.134	1.176
C00249	Palmitic	GCMS	0.587780	-0.556	0.758	-0.337	0.971
	Chlordiazepoxide	PFPP	0.595108	-0.545	0.035	-3.672	0.827
	X2.AMINONICOTINIC..3.HYDROXPICO LINAMIDE	HILIC	0.596444	-0.543	0.126	-2.106	0.783
C04583	6-Hydroxyl-1,6- dihydropurineribonucleoside	PFPP	0.602164	-0.534	0.146	-1.950	0.723
C00408	Pipecolic.Isom2	HILIC	0.610525	0.522	0.483	0.798	1.106
C01909	Dethiobiotin	PFPP	0.611293	-0.521	0.607	0.572	1.045
	1-L-Leucyl-L-Proline	PFPP	0.611660	-0.520	0.170	-1.799	0.910
C01133	N-Acetyl-D-glucosamine	PFPP	0.612445	-0.519	0.640	0.518	1.221
C00188	L-Threonine	PFPP	0.612654	-0.519	0.189	-1.692	0.904
C00149	Malic	GCMS	0.614080	-0.517	0.645	0.510	1.067
C00074	phosphoenolpyruvic	HILIC	0.618065	-0.511	0.721	-0.392	0.959
C02946	acetamidobutanoate_1	HILIC	0.625025	-0.501	0.632	-0.532	0.942
C07499	Phenylethylmalonamide	PFPP	0.628631	-0.495	0.398	0.984	1.064
C03955	N6-Acetyl-N6-hydroxy-L-lysine	PFPP	0.631849	-0.491	0.281	-1.310	0.713
C04428	Epirubicinol	PFPP	0.632423	-0.490	0.344	-1.121	0.783
C01657	Ac-Tyr-OEt	PFPP	0.638826	-0.481	0.116	-2.195	0.747
C00026	X2-ketoglutaric	GCMS	0.638869	0.480	0.025	4.154	4.746
C00062	Arginine	HILIC	0.639448	-0.480	0.950	0.068	1.008
C02571	Acetylcarnitine	HILIC	0.640330	-0.478	0.166	-1.824	0.643
C00612	acetylspermidine	HILIC	0.641445	0.477	0.304	1.237	1.203
C00180	BENZOIC..4.HYDROXYBENZALDEHYDE	HILIC	0.641559	-0.477	0.550	-0.672	0.909
C00042	Succinic	GCMS	0.644704	-0.472	0.070	2.762	1.158
C20827	X3-hydroxyisovaleric	GCMS	0.644985	-0.472	0.890	-0.151	0.971
C00029	UDP.Glucose..UDPgaltose	HILIC	0.646911	-0.469	0.118	-2.174	0.782
C00294	INOSINE	HILIC	0.647062	-0.469	0.315	-1.203	0.958
C00170	5-Methylthioadenosine	PFPP	0.649608	-0.465	0.127	-2.092	0.836
C00624	N.ACETYL.L.GLUTAMIC	HILIC	0.650913	-0.463	0.076	-2.667	0.818
C11102	HymexazolO-glucoside	PFPP	0.655956	-0.456	0.276	-1.330	0.912
C11766	Rivastigmine	PFPP	0.657511	0.454	0.241	1.458	1.397
	Cmpd 6.534	GCMS	0.659489	-0.451	0.150	-1.927	0.905
C00785	Urocanate	PFPP	0.661374	-0.448	0.666	0.477	1.185
C00047	Lysine	HILIC	0.663237	-0.446	0.901	0.136	1.018
C08342	Triglochinin	PFPP	0.666929	-0.440	0.792	-0.288	0.915
C00148	Proline	GCMS	0.667041	0.440	0.616	0.558	1.088
	Phe Glu Trp	PFPP	0.670139	0.436	0.635	0.527	1.129
C03592	5-Methyldeoxycytidine	PFPP	0.671690	0.434	0.508	0.749	1.763
C01239	Morantel	PFPP	0.677869	-0.425	0.596	0.592	1.044

C01404	Dimethyl-L-arginine	PFPP	0.678765	-0.424	0.285	-1.297	0.773
C00299	Uridine	HILIC	0.679687	-0.422	0.119	-2.163	0.876
C00408	Pipecolic.isom1	HILIC	0.679849	0.422	0.563	0.649	1.086
C11045	Glutamylphenylalanine	PFPP	0.680416	-0.421	0.041	-3.445	0.824
C00074	PEP	HILIC	0.683014	-0.418	0.533	-0.703	0.929
C11305	Triphenyltetrazoliumchloride	PFPP	0.693368	-0.403	0.161	-1.856	0.703
C04421	N-Succinyl-L-2,6-diaminoheptanedioate	PFPP	0.693612	-0.403	0.603	-0.580	0.701
C11158	Topotecan	PFPP	0.694294	-0.402	0.144	-1.963	0.642
C11097	F5231	PFPP	0.702030	-0.391	0.203	-1.621	0.879
C08429	Clitidine5-phosphate	PFPP	0.709820	-0.380	0.684	0.449	1.038
C01152	Methylhistidine	HILIC	0.711117	0.379	0.571	0.633	1.075
C00581	Guanidoacetic	HILIC	0.711226	-0.378	0.637	-0.523	0.953
C00864	Pantothenic	HILIC	0.712180	0.377	0.594	0.594	1.075
C06469	Neuraminicacid	PFPP	0.712780	-0.376	0.070	-2.766	0.697
C00437	N-Acetylornithine	PFPP	0.719084	-0.368	0.166	-1.822	0.823
	Mevalonolactone	GCMS	0.719890	-0.366	0.798	-0.279	0.940
C02700	L-Formylkynurenine	PFPP	0.720025	-0.366	0.450	-0.867	0.883
C00216	D.....ARABINOSE	HILIC	0.720331	-0.366	0.191	-1.683	0.824
C00079	Phenylalanine.1	HILIC	0.722733	-0.363	0.933	-0.091	0.988
C00123	Leucine	HILIC	0.724197	-0.361	0.815	0.255	1.035
C02918	Methylnicotinamide	HILIC	0.728076	-0.355	0.597	-0.590	0.949
C00111	Glyceronephosphate	PFPP	0.729112	0.354	0.376	1.036	1.134
C06424	Tetradecanoic	GCMS	0.732863	-0.349	0.749	-0.351	0.971
C00475	CYTIDINE..ISOLEUCINE	HILIC	0.733088	-0.348	0.397	-0.986	0.934
C00097	L-Cysteine	PFPP	0.733737	-0.348	0.107	-2.276	0.807
	UK51	HILIC	0.733972	-0.347	0.842	0.217	1.032
C00257	GLUCONIC	HILIC	0.737627	-0.342	0.531	-0.706	0.932
C00259	arabinose	HILIC	0.738971	-0.340	0.191	-1.683	0.824
C04020	Meprobamate	PFPP	0.739363	-0.340	0.378	-1.032	0.891
C00503	Erythritol	GCMS	0.739830	-0.339	0.247	1.433	1.095
C00666	Diaminopimelic	HILIC	0.742037	-0.336	0.925	0.102	1.015
C10658	Magnoshinin	PFPP	0.742268	-0.336	0.286	-1.296	0.929
C01005	O-Phospho-L-serine	PFPP	0.746390	0.330	0.528	0.713	1.098
	Phosphate	GCMS	0.746758	-0.330	0.621	0.549	1.032
C01004	Trigonelline	HILIC	0.752140	-0.323	0.882	0.162	1.044
C03017	Propanoyl_carnitine	HILIC	0.757025	-0.316	0.128	-2.091	0.808
C00300	Creatine	HILIC	0.758142	-0.314	0.817	-0.252	0.975
C00049	Aspartic	HILIC	0.759544	0.313	0.841	0.218	1.039
C03017	Propionylcarnitine_isomer1	HILIC	0.759843	-0.312	0.102	-2.329	0.803
	2-Methylbutyrylcarnitine	PFPP	0.763217	-0.308	0.303	-1.242	0.785
C00392	Mannitol	PFPP	0.763458	-0.307	0.627	-0.540	0.950
C05939	Linatine	PFPP	0.764695	-0.306	0.216	-1.565	0.888
C00785	Urocanate	HILIC	0.765456	-0.305	0.288	-1.290	0.807
	Leu Ala	PFPP	0.766399	-0.303	0.888	-0.153	0.964

C13624	X3.AMINO.3..4.HYDROXYPHENYL.PRO PAN	HILIC	0.767699	-0.302	0.609	-0.569	0.955
C00078	Tryptophan	HILIC	0.768261	-0.301	0.883	0.160	1.021
C15048	7-(Acetyloxy)-3-(3-pyridinyl)-2H-1-benzopyran-2-one	PFPP	0.768990	-0.300	0.199	-1.643	0.880
C00245	Taurine	HILIC	0.769158	-0.300	0.176	-1.762	0.787
C01225	sn-glycero-3-Phospho-1-inositol	PFPP	0.772892	-0.295	0.224	-1.528	0.854
	Ethylmalonic	GCMS	0.773383	-0.294	0.418	-0.936	0.974
C00263	L.HOMOSERINE	HILIC	0.773439	-0.294	0.122	-2.137	0.839
	Cmpd 22.211	GCMS	0.775094	-0.292	0.540	0.689	1.061
C03853	Bis(glycerophospho)-glycerol	PFPP	0.778246	-0.288	0.987	0.017	1.002
	Acetylgarginine	HILIC	0.778402	-0.287	0.876	-0.170	0.979
C00041	alanine	HILIC	0.785948	-0.277	0.715	-0.401	0.967
C10880	Savinin	PFPP	0.786236	-0.277	0.716	-0.400	0.926
C01035	Guanidinobutanoic	HILIC	0.787821	-0.275	0.128	-2.090	0.657
C00250	Pyridoxal	PFPP	0.789873	-0.272	0.114	-2.211	0.803
C10556	Deoxypodophyllotoxin	PFPP	0.791512	-0.270	0.665	0.479	1.069
C00152	Asparagine	PFPP	0.792333	-0.269	0.940	-0.082	0.994
C06656	Deoxyguanidinoproclavaminicacid	PFPP	0.792713	0.268	0.055	3.066	1.372
C11224	Isonicotinamide, 2-propyl-	PFPP	0.793897	-0.267	0.955	-0.061	0.983
D00496	D.PENICILLAMINE	HILIC	0.795977	-0.264	0.504	0.757	1.070
C00487	Carnitine	HILIC	0.796015	-0.264	0.317	-1.198	0.863
C00791	Creatinine	HILIC	0.796808	-0.263	0.693	0.436	1.060
	Cmpd 17.092	GCMS	0.796889	0.263	0.499	0.767	1.237
C00099	b.ALANINE	HILIC	0.798719	-0.260	0.715	-0.401	0.967
	Cmpd 11.057	GCMS	0.799768	-0.259	0.573	-0.630	0.939
C01512	Ethynylestradiol 3-sulfate	PFPP	0.801056	0.257	0.726	-0.385	0.943
C08995	AurasperoneD	PFPP	0.801198	-0.257	0.798	0.279	1.024
	Cmpd 5.775	GCMS	0.802628	0.255	0.286	1.295	1.068
C00188	L.threonine	HILIC	0.803455	-0.254	0.525	0.718	1.078
C15331	17beta-Hydroxy-6beta-methyl-5alpha-androstan-3-onepropionate	PFPP	0.805421	0.251	0.495	0.775	6.926
C06455	Hydroxymethylphosphonate	PFPP	0.807375	-0.249	0.887	0.154	1.078
C00392	D.MANNITOL	HILIC	0.808507	-0.247	0.994	0.008	1.001
C03224	3,5-Dibromo-L-tyrosine	PFPP	0.810221	0.245	0.250	1.423	89.516
C00286	ATP2..dGTP	HILIC	0.810237	0.245	0.377	1.034	1.100
C03761	X3.HYDROXY.3.METHYLGLU_M.H.C2H 4O2	HILIC	0.811010	-0.244	0.754	0.343	1.065
C06658	Ser Pro	PFPP	0.812367	-0.242	0.775	-0.312	0.963
C00794	Sorbitol	HILIC	0.812975	-0.241	0.927	0.099	1.011
	N-alpha-Acetyl-L-arginine	PFPP	0.814549	-0.239	0.728	-0.382	0.959
C00847	X4.PYRIDOXIC	HILIC	0.815513	0.238	0.768	0.323	1.025
C00037	Glycine	GCMS	0.815716	0.238	0.340	1.133	1.141
C01013	X3-hydroxypropionic	GCMS	0.816242	0.237	0.422	0.927	1.096
C03761	X3.HYDROXY.3.METHYLGLUTARIC	HILIC	0.816265	-0.237	0.594	0.595	1.133
C04137	N2-(D-1-Carboxyethyl)-L-arginine	PFPP	0.817137	-0.236	0.117	2.181	1.190

C00719	BETAINE	HILIC	0.819228	-0.233	0.892	-0.147	0.983
C01585	CAPROIC_	HILIC	0.819592	-0.233	0.863	-0.188	0.987
C00183	Valine.1	HILIC	0.820563	-0.231	0.891	-0.149	0.982
C14416	3-Amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole	PFPP	0.822348	-0.229	0.548	-0.675	0.943
C12987	N2-Acetyl-L-aminoadipyl-delta-phosphate	PFPP	0.823595	0.227	0.275	-1.331	0.802
C00188	Threonine	HILIC	0.823980	-0.227	0.841	-0.219	0.973
	Cmpd 38.894	GCMS	0.826722	-0.223	0.416	0.942	1.252
C00137	Myoinositol	GCMS	0.828158	0.221	0.086	2.521	1.187
C01879	oxoproline	HILIC	0.833166	-0.215	0.882	-0.161	0.982
C00258	D.GLYCERIC	HILIC	0.834306	-0.213	0.843	0.215	1.039
C00047	lysine	HILIC	0.836427	-0.211	0.872	-0.176	0.985
C00183	Valine	HILIC	0.837095	-0.210	0.843	0.215	1.028
C00093	beta-Glycerophosphoric acid	PFPP	0.839476	-0.207	0.660	-0.486	0.927
	Cmpd ion 243	GCMS	0.842853	-0.202	0.423	-0.925	0.951
C00041	Alanine	HILIC	0.843894	-0.201	0.642	-0.514	0.954
C00079	Phenylalanine.2	HILIC	0.847354	-0.196	0.849	-0.208	0.972
C00137	Cmpd 36.555	GCMS	0.850263	-0.193	0.497	-0.770	0.913
C00281	D-Sedoheptulose 7-phosphate	PFPP	0.851282	-0.191	0.353	-1.095	0.841
C00135	Histidine	HILIC	0.853290	0.189	0.599	0.587	1.089
C10313	Chryso-obtusinglucoside	PFPP	0.853359	-0.189	0.230	-1.504	0.902
C00035	GDP	HILIC	0.856590	-0.184	0.871	0.177	1.031
C00791	creatinine	HILIC	0.856989	-0.184	0.468	0.828	1.107
C00290	Fibrin	PFPP	0.857983	0.183	0.626	0.542	1.105
C00380	Cytosine	PFPP	0.864473	-0.174	0.661	-0.485	0.947
C04336	N-Glycolyl-D-mannosamine6-phosphate	PFPP	0.866244	-0.172	0.735	-0.372	0.938
C00041	Alanine	GCMS	0.867050	0.171	0.868	-0.181	0.979
C00031	Cmpd Glucopyranose	GCMS	0.867933	-0.170	0.106	2.289	1.205
C10826	Tomatidine	PFPP	0.869460	0.168	1.000	1.000	1.000
C10355	Fluorescein	PFPP	0.869976	-0.167	0.853	-0.202	0.974
	Valine_Betaine	HILIC	0.870161	-0.167	0.780	0.306	1.042
	Demethylazelastine	PFPP	0.870181	0.167	0.790	0.291	1.038
C16403	4-Amino-2-hydroxylamino-6-nitrotoluene	PFPP	0.870647	-0.166	0.659	-0.489	0.942
C01673	Calcitriol	PFPP	0.872242	0.164	1.000	1.000	1.000
C05828	Methylimidazoleacetic	HILIC	0.873258	-0.163	0.789	0.293	1.041
C00188	Threonine	GCMS	0.874426	0.161	0.606	0.575	1.065
C00258	Glyceric	GCMS	0.875443	0.160	0.594	-0.595	0.800
C15439	2-Methacryloyloxyethylphenylphosphate	PFPP	0.880299	-0.154	0.672	-0.468	0.928
C02486	DL.β. LEUCINE	HILIC	0.880353	-0.154	0.942	-0.080	0.990
C16199	X5.sulfosalicylic	HILIC	0.880689	-0.153	0.824	0.243	1.013
C00065	Serine	GCMS	0.881479	0.152	0.829	-0.236	0.978
C00327	Citrulline	HILIC	0.882865	0.150	0.988	0.016	1.002
C00082	Tyrosine	GCMS	0.883276	0.150	0.232	1.495	1.158

C00073	METHIONINE	HILIC	0.883656	-0.149	0.427	0.916	1.108
	Gly.Val	HILIC	0.884420	0.148	0.928	0.098	1.020
C00062	DL.ARGININE	HILIC	0.884794	-0.148	0.681	-0.454	0.960
C00186	lactate	HILIC	0.886406	-0.146	0.462	-0.842	0.934
C06323	Isoquinoline	PFPP	0.889607	-0.142	0.097	2.392	1.461
C03793	Trimethyllysine	HILIC	0.889824	0.141	0.686	0.446	1.060
C00078	DL.TRYPTOPHAN	HILIC	0.890728	-0.140	0.959	-0.056	0.994
C01924	Homoarginine	PFPP	0.892921	-0.137	0.317	-1.198	0.904
C00031	Glucose	GCMS	0.892996	-0.137	0.157	1.879	1.164
C06870	7-Hydroxytrifluoperazine	PFPP	0.894090	-0.136	0.420	-0.931	0.703
C12768	Timepidiumbromide	PFPP	0.894759	0.135	0.684	-0.450	0.922
C03797	OxidizedPhotinusluciferin	PFPP	0.895471	-0.134	0.929	-0.097	0.983
C00022	Pyruvate	HILIC	0.896216	0.133	0.218	-1.555	0.932
C01175	1-O-Sinapoyl-beta-D-glucose	PFPP	0.897541	-0.131	0.619	0.553	1.116
C00064	Glutamine	GCMS	0.898514	0.130	0.547	0.677	1.092
C11821	5-Hydroxyisourate	PFPP	0.899513	0.129	0.751	-0.348	0.939
C00780	Cotinine	PFPP	0.899550	0.129	0.527	-0.714	0.894
C02728	Ne-Methyl-L-lysine	PFPP	0.899662	-0.129	0.275	1.333	1.063
C00062	Arginine	PFPP	0.900374	-0.128	0.647	0.507	1.024
	Cmpd 9.839	GCMS	0.900968	0.127	0.572	-0.633	0.925
C20826	X2.Methylbutyrylcarnitine.Isovalerylcarnitine	HILIC	0.901017	-0.127	0.310	-1.220	0.794
C00009	Cmpd 24.288	GCMS	0.901025	-0.127	0.164	1.837	1.577
C05636	3-Hydroxykynurenamine	PFPP	0.902283	0.125	0.953	0.064	1.060
C00314	Pyridoxine	HILIC	0.902933	0.124	0.529	0.710	1.123
C00385	Xanthine	HILIC	0.902946	0.124	0.623	0.546	1.060
	2-Hydroxy-3-(4-methoxyethylphenoxy)-propanoic acid	PFPP	0.904170	0.123	0.600	0.584	1.092
C04000	Benzyl2-methyl-3-oxobutanoate	PFPP	0.904392	-0.122	0.925	-0.102	0.990
C07751	Dofetilide	PFPP	0.905433	-0.121	0.930	-0.095	0.979
C20826	Isovalerylcarnitine	HILIC	0.905986	-0.120	0.346	-1.115	0.815
C00791	Creatinine	PFPP	0.910212	-0.115	0.735	0.371	1.037
C00078	L-Tryptophan	PFPP	0.914111	-0.110	0.721	-0.392	0.955
C00153	Nicotinamide	PFPP	0.915722	0.108	0.576	0.625	1.121
C00042	succinic	HILIC	0.916353	-0.107	0.406	0.965	1.197
C19569	X3.SUCCINOYLPYRIDINE	HILIC	0.916526	-0.107	0.511	0.743	1.107
C01586	HIPPURIC	HILIC	0.916902	-0.106	0.511	0.743	1.107
	Cmpd ion 192	GCMS	0.916927	-0.106	0.980	-0.027	0.997
	Cmpd Pyrido	GCMS	0.918572	-0.104	0.731	-0.378	0.960
C00153	Nicotinamide	HILIC	0.918727	-0.104	0.577	0.623	1.078
C14663	Testosterone isocaproate	PFPP	0.923816	0.098	1.000	1.000	1.000
	Pro.Gly	HILIC	0.925331	-0.096	0.387	-1.010	0.877
C06559	Deethylatrazine	PFPP	0.925448	-0.095	0.761	-0.333	0.956
C10227	Gallocatechin-(4alpha->8)-epigallocatechin	PFPP	0.925951	-0.095	0.505	0.755	1.093
C11992	L-Oleandrosyl-oleandolide	PFPP	0.927696	0.093	1.000	1.000	1.000

C09784	10-Hydroxyloganin	PFPP	0.929737	-0.090	0.196	-1.655	0.907
C00160	Glycolic	GCMS	0.930437	-0.089	0.558	0.658	1.151
C00077	Ornithine	HILIC	0.931399	0.088	0.873	0.174	1.023
C01677	His Glu	PFPP	0.931661	-0.087	0.814	0.257	1.110
C01879	Pyroglutamic	GCMS	0.932890	0.086	0.664	0.480	1.069
C09020	bromovulone I	PFPP	0.936571	-0.081	0.599	0.586	1.139
C00474	ADONITOL_M.Cl	HILIC	0.936960	-0.081	0.900	-0.136	0.972
	Glycyl.Proline	HILIC	0.938958	-0.078	0.365	-1.064	0.887
	Cmpd 28.081	GCMS	0.940263	0.076	0.334	1.148	1.107
C00387	8-Hydroxy-deoxyguanosine	PFPP	0.942337	-0.074	0.239	-1.467	0.889
C00077	Ornithine.1	HILIC	0.942338	-0.074	0.640	-0.518	0.960
C00077	Ornithine	GCMS	0.942581	-0.073	0.153	1.902	1.102
C00611	Lacto-N-biose I	PFPP	0.942711	-0.073	0.867	0.183	1.060
C15422	2alpha-Methyl-17beta-[(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]-5alpha-	PFPP	0.943005	0.073	1.000	1.000	1.000
C02714	N-Acetylputrescine	PFPP	0.943199	-0.073	0.358	-1.084	0.894
	Desmosine	PFPP	0.945136	-0.070	0.161	-1.854	0.455
C02714	N.acetylputrescine	HILIC	0.945140	-0.070	0.335	-1.146	0.914
C00073	Methionine	GCMS	0.945791	0.069	0.959	-0.056	0.996
C00864	Pantothenic	GCMS	0.949941	0.064	0.947	0.072	1.019
C10523	Psoralidin	PFPP	0.951342	0.062	0.912	-0.120	0.988
C00429	Hydrouracil	HILIC	0.952204	0.061	0.852	0.204	1.040
C00906	Dihydrothymine	HILIC	0.953154	0.060	0.860	0.193	1.041
C01152	N(pi)-Methyl-L-histidine	PFPP	0.953686	0.059	0.575	0.628	1.049
C12106	AminoDAHP	PFPP	0.954611	-0.058	0.779	-0.307	0.945
C11698	UH-301	PFPP	0.954786	0.058	0.074	2.703	1.638
C02237	D.PYROGLUTAMIC	HILIC	0.955442	0.057	0.379	1.031	1.161
C09755	Hesperidin	PFPP	0.956490	-0.056	1.000	1.000	1.000
C00475	Cytidine	PFPP	0.956610	-0.055	0.504	0.757	1.117
C00407	Isoleucine	GCMS	0.956787	0.055	0.982	0.024	1.002
C00123	Leucine	GCMS	0.962057	0.048	0.966	0.046	1.003
C12986	N2-Acetyl-L-aminoadipate	PFPP	0.962764	-0.048	0.306	-1.231	0.893
	Cmpd 25.803	GCMS	0.963653	-0.046	0.224	1.529	1.165
C01561	Calcidiol	PFPP	0.964331	0.046	1.000	1.000	1.000
C13179	Fleroxacin	PFPP	0.965090	0.045	0.424	0.923	1.471
C01924	Homoarginine	HILIC	0.968006	-0.041	0.418	0.937	1.162
	L-Acetylcarnitine	PFPP	0.970568	-0.038	0.461	-0.842	0.737
C04203	N,N-Dimethyl-1,4-phenylenediamine	PFPP	0.971021	0.037	0.958	-0.057	0.991
C08883	Uscharidin	PFPP	0.971919	0.036	0.669	0.473	1.080
C00366	Uric	HILIC	0.972803	-0.035	0.936	0.088	1.021
C01746	Piperidine	PFPP	0.978526	-0.027	0.929	-0.096	0.988
	N-Acetylcadaverine	PFPP	0.979401	-0.026	0.481	0.803	1.175
C05598	Methylhippuric.Phenylacetyl glycine_1	HILIC	0.980259	0.025	0.743	0.360	1.046
C00079	Phenylalanine	GCMS	0.980767	-0.025	0.938	-0.085	0.995
C01210	N-Methylethanolaminephosphate	PFPP	0.980894	0.024	0.997	-0.004	1.000

	ADP..dGDP	HILIC	0.981089	0.024	0.590	0.602	1.093
C04721	N-(3alpha,12alpha-dihydroxy-5beta-cholan-24-oyl)-glycine	PFPP	0.984896	-0.019	0.087	-2.514	0.839
	Biotripyrrin-b	PFPP	0.985421	0.019	0.408	0.959	1.201
C11075	N-Carboxytocainide	PFPP	0.986845	-0.017	0.610	-0.567	0.852
C03411	N-Glycosyl-L-asparagine	PFPP	0.986857	-0.017	0.033	-3.770	0.854
	N.acetyl.cytidine	HILIC	0.987957	0.015	0.585	0.610	1.056
C02811	Anhydrotetracycline	PFPP	0.988654	0.014	0.550	0.671	1.142
C07246	Sertraline	PFPP	0.989783	-0.013	0.199	-1.644	0.915
C00186	Lactic	GCMS	0.990318	-0.012	0.307	1.230	1.101
C07493	Dyphylline	PFPP	0.990500	0.012	0.562	0.651	1.122
C11172	Simazine	PFPP	0.990767	0.012	0.439	0.890	1.107
C11571	2-p-Tolyl-5,6,7,8-tetrahydrobenzo[d]imidazo[2,1-b]thiazole	PFPP	0.991636	-0.011	1.000	1.000	1.000
	Cmpd 25.727	GCMS	0.992161	-0.010	0.237	1.475	1.155
C13280	Nicorandil	PFPP	0.992258	0.010	0.450	0.867	1.087
	Val Val	PFPP	0.993408	-0.008	1.000	1.000	1.000
C00314	pyridoxine	HILIC	0.993748	0.008	0.775	0.312	1.042
C02350	ALLANTOIN	HILIC	0.994612	-0.007	0.630	0.534	1.104
C00314	5-Hydroxydopamine	PFPP	0.994645	0.007	0.928	0.099	1.013
C00120	D-Biotin	PFPP	0.994853	0.007	0.809	0.264	1.045
C00922	adipate	PFPP	0.995295	-0.006	0.802	-0.273	0.944
C05118	S-(2-Methylbutanoyl)-dihydrolipoamide	PFPP	0.996714	0.004	0.786	0.297	1.043
	Cmpd 6.468	GCMS	0.996893	-0.004	0.956	-0.060	0.988
C02487	Val Ser Pro	PFPP	0.997143	0.004	0.763	-0.330	0.982
C00135	L.HISTIDINE	HILIC	0.997538	-0.003	0.399	0.981	1.132
C09332	Tetrahydrofolyl-[Glu](2)	PFPP	0.997566	0.003	0.812	0.259	1.029
C15207	17beta-Estradiol-3-(beta-D-glucuronide)17-sulfate	PFPP	0.997730	0.003	0.890	0.151	1.026
C00423	trans-Cinnamate	PFPP	0.997863	-0.003	0.711	0.407	1.056
C10196	Scolymoside	PFPP	0.999568	-0.001	0.889	-0.152	0.995
C10559	Diphyllin	PFPP	0.999606	0.001	0.986	0.019	1.006
C01251	2-Methylcitric acid	PFPP	0.999700	0.000	0.164	-1.832	0.836
	Cmpd 10.350	GCMS	0.999825	0.000	0.714	0.404	1.033

5. 2 Annexe : Publications et posters

Publications relatives à ma thèse

Mylonas E, Janin M, Bawa O, Opolon P, David M, Quivoron C, Bernard O A, Ottolenghi C, DeBotton S, Penard-Lacronique V. (2014) Isocitrate dehydrogenase (*IDH*)2 R140Q mutation induces myeloid and lymphoid neoplasms in mice. *Leukemia*, 28(6); 1343-6.

Janin M, ..., Penard-Lacronique V, Ottolenghi C, DeBotton S, (2014) Serum 2-HG production in IDH1 and IDH2 mutated de novo: a study by the Acute Leukemia French Association (ALFA) group . *J. Clin. Oncol.*, 32(4): 297-305.

Letouzé E, Martinelli C, Lorient C, Burnichon N, Abermil N, Ottolenghi C, Janin M, Menara M, Nguyen AT, Benit P, Buffet A, Marcellou C, Bertherat J, Amar L, Rustin P, De Reyniès A, Gimenez-Roqueplo AP, Favier J (2013) SDH mutations establish a hypermethylator phenotype in paraganglioma. *Cancer Cell.*, 23(6): 739-52.

Publications supplémentaires

Giovanni S., et al., (2015) Alteration of ornithine metabolism leads to dominant and recessive hereditary spastic paraplegia. *Brain*.

Lepoutre-Lussey C., et al., (2015) From NF1 to SDHB knockout : successes and failures in the quest for animal models of pheochromocytoma. *Mol. Cell. Endoc.*

El-Habr E.A., et al., Reprogramming GABA metabolism towards GHB production decreases 5-hydroxymethylcytosine levels to repress malignant glioma cell growth. *Nature Communication*, (Submitted).

Posters scientifiques

ICIEM 2013, Barcelone (Espagne) :

Serum 2-HG production in IDH1 and IDH2 mutated de novo AML : A Study by the Acute Leukemia French Association (ALFA) Group.

SSIEM 2014, Innsbruck (Autriche) :

Multiple stable isotope labeled internal standards for gas chromatography/mass spectrometry in the clinical setting.

Phénotype métabolique des tumeurs associées à des anomalies du cycle de Krebs. Maxime JANIN

Le cycle de Krebs occupe une place centrale dans le métabolisme cellulaire et est le point de jonction de nombreuses voies essentielles. Depuis le début des années 2000, un lien a été démontré entre l'apparition de certains cancers et des mutations affectant des gènes codant pour des enzymes du cycle de Krebs, i.e., la succinate déshydrogénase, la fumarase ou les iso-enzymes 1 et 2 de l'isocitrate déshydrogénase (IDH). Les mutations des gènes *IDH* sont présentes dans 15 à 20 % des leucémies myéloïdes aigues (LAM) et jusqu'à 80 % dans certains gliomes. Ces mutations affectent le site actif des enzymes et elles induisent une néo-fonction enzymatique qui se traduit par la production et l'accumulation d'un oncométabolite : le stéréoisomère D du 2-hydroxyglutarate (D-2-HG) responsable de dérégulations énergétiques et épigénétiques au sein de la cellule.

Afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu entre ces anomalies et la pathologie humaine, mon travail de thèse a impliqué le développement de différentes méthodes analytiques :

- tout d'abord une méthode robuste de séparation et de quantification des stéréoisomères D et L par dérivation chirale du 2-HG, ceci en GC tandem MS,
- également par GC tandem MS, des méthodes métabolomiques ciblées à haute spécificité pour l'analyse de plus de 120 composés d'intérêt clinique,
- des méthodes analytiques à haute résolution et non-ciblées (masse exacte; n=360 composés) adaptées à l'étude de cellules,
- et des méthodes d'étude de flux métaboliques sur culture cellulaire basées sur l'analyse des dérivés de traceurs marqués aux isotopes stables.

Le développement de ces méthodes m'a permis d'obtenir les résultats suivants.

J'ai démontré l'importance du D-2-HG comme marqueur de la présence de mutations *IDH1/2* dans une large cohorte de patients leucémiques, à la fois pour le diagnostic et pour le suivi des patients sous traitement. Notre étude pilote a conduit à utiliser ce paramètre en pratique hospitalière courante dans le laboratoire de chimie analytique de l'institut Gustave Roussy (IGR; Villejuif).

L'étude de profils métaboliques associés aux mutations affectant les enzymes IDH2 et succinate déshydrogénase nous a permis d'identifier des mécanismes compensatoires du dysfonctionnement du cycle de Krebs, par exemple la sur-activation de la pyruvate carboxylase. Nous avons par ailleurs montré que ces mécanismes ne sont que partiellement efficaces; ils pourraient ainsi servir de cibles thérapeutiques.

Une mutation du gène *IDH2* (R140Q) est retrouvée chez des patients atteints de LAM et chez des patients possédant une acidurie D-2-hydroxyglutarique, maladie héréditaire du métabolisme extrêmement rare. Un inhibiteur spécifique de l'enzyme IDH2 possédant la mutation R140Q est actuellement testé comme traitement dans un essai clinique à l'IGR pour les patients leucémiques. Nous avons étudié les effets de ce composé sur des fibroblastes de notre patient atteint d'acidurie D-2-hydroxyglutarique. Nous avons confirmé ses effets sur l'enzyme IDH et observé des effets secondaires sur le métabolisme des lipides et du cycle de Krebs, à la fois dans les fibroblastes témoin et du patient. Cet inhibiteur étant connu pour avoir des effets sur la différenciation cellulaire, nos résultats pourraient permettre d'expliquer les mécanismes impliqués.

Ce travail a apporté de nouveaux outils pour l'exploration des maladies métaboliques traditionnelles ainsi que de certains types de cancers, et il met en avant de nouvelles illustrations de la puissance de l'approche métabolique pour identifier des points d'intervention et de surveillance thérapeutique personnalisée des patients ("théranostique").

Mots clés : Isocitrate déshydrogénase, GC MS, Métabolomique, Cancer, Cycle de Krebs.